

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Incidencia de los bifenoles policlorados sobre los procesos
metabólicos de ciertos microhongos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Cristina Tejedor Gilmartín

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5324474317

T₁
547
TEJ

615312367
i36259494

INCIDENCIA DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS SOBRE LOS
PROCESOS METABOLICOS DE CIERTOS MICROHONGOS

M E M O R I A



PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

POR

MA CRISTINA TEJEDOR GILMARTIN

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

BIBLIOTECA

Nº Registro ...33295...

MADRID, JUNIO 1977

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Química Orgánica General, bajo la dirección del Dr. D. Miguel Anxel Murado García, a quien expreso mi sincero reconocimiento por sus acertadas orientaciones y enseñanzas.

Asimismo, hago patente mi agradecimiento al Dr. D. Gonzalo Baluja Marcos, Director del Departamento de Contaminantes Ambientales, por su experimentado consejo.

También he de expresar mi agradecimiento a los Drs. J.M. Lopez Sancho y M.C. Refolio Refolio, por su colaboración en el tratamiento matemático de los resultados numéricos correspondientes a los ensayos manométricos.

Finalmente, debo hacer constar mi gratitud para con mis compañeros de laboratorio: M.J. Gonzalez, L.M. Hernandez Saint-Aubín y J.A. Lázaro Campos por sus continuos estímulos, así como para con todas las ayudas que, aunque anónimas, han contribuido a completar esta memoria.

I N D I C E

	<u>Pag.</u>
"A" - CONSIDERACIONES TEORICAS	
I - Compuestos xenobióticos. Alcance y limitaciones del concepto.....	2
II - Dinámica de los compuestos xeno- bióticos en el medio ambiente.....	5
III - Metabolismo de compuestos xeno- bióticos.....	14
IV - Bifenilos policlorados (PCBs). 1.- Características físicas, químicas y técnicas.....	27
V - Bifenilos policlorados. 2.- Aspec- tos estructurales susceptibles de afectar su dinámica bioquímica. Problemática toxi- cológica y ambiental.....	32
VI - Enfoque y justificación del pre- sente trabajo.....	45
"B" - PARTE EXPERIMENTAL	
B.I - METODOLOGIA Y MATERIALES	
1 - Técnicas de cultivo.....	51
1.1 - Incorporación de los PCBs y otros organoclorados a los medios de cultivo.....	53
2 - Extracción de los compuestos organo- clorados - PCBs, DDT y Aldrín -.....	56

	ii
2.1 - Purificación de los extractos.....	58
2.2 - Determinación de compuestos organoclorados por cromatografía gas- líquido.....	60
2.3 - Evaluación de las mezclas de bifenilos policlorados.....	63
3 - Fraccionamiento y determinación de componentes celulares.....	66
3.1 - Valoración del DNA (Reacción de Dische o de la difenilamina).....	71
3.2 - Valoración del RNA (Reacción de Mejbaum o del orcinol).....	74
3.3 - Extracción y valoración de proteínas.....	76
3.4 - Valoración de ácido kójico.....	78
4 - Ensayo de algunas actividades enzimáticas características de la frac- ción microsómica.....	80
4.1 - Preparación del material bio- lógico.....	80
4.1.1 - Homogeneización.....	80
4.1.2 - Separación de la fracción microsómica.....	82
4.2 - Condiciones de los ensayos enzimáticos.....	86
4.3 - Valoración de las actividades enzimáticas.....	88
4.4 - Investigación de la presencia de citocromo P - 450.....	93

5 - Determinación micromanométrica del consumo de oxígeno por los microor- ganismos.....	95
6 - Valoración de la actividad de transporte electrónico.....	99
6.1 - Ensayos para la detección de mutantes con deficiencias respiratorias (en <u>Saccharomyces cerevisiae</u>).....	103

B.II - RESULTADOS Y SU INTERPRETACION

1 - Los PCBs como estructuras alta- mente resistentes a la acción de los mi- croorganismos.....	106
2 - El proceso de acumulación de los PCBs.....	116
3 - Efectos de los PCBs sobre el desarrollo de los microorganismos ensa- yados.....	127
3.1 - Desarrollo de <u>Aspergillus</u> <u>flavus</u> en presencia de Aroclor-1254 : La aproximación dosis-respuesta (peso seco y niveles relativos de RNA).....	130
3.2 - Influencia del grado medio de cloración sobre la toxicidad de los PCBs frente a <u>Aspergillus flavus</u>	139
3.3 - La respuesta de <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u> a los PCBs.....	145
4 - Los PCBs como posibles induc- tores enzimáticos injustificados.....	154

4.1 - Metabolismo "aloinducido"	
de otros xenobióticos "in vivo".....	157
4.2 - Ensayos enzimáticos	
"in vitro". Ausencia de citocromo	
P - 450.....	164
5 - Efectos de los PCBs sobre	
el consumo de oxígeno.....	165
6 - Efectos de los PCBs sobre	
el transporte electrónico en <u>Saccha-</u>	
<u>romyces cerevisiae</u>	172
7 - Influencia de los PCBs	
sobre la producción de ácido kójico	
en <u>Aspergillus flavus</u>	178
"C" - CONCLUSIONES	185
"D" - BIBLIOGRAFIA	192

"A" - CONSIDERACIONES
TEORICAS

I - COMPUESTOS XENOBIOTICOS. ALCANCE Y LIMITACIONES DEL CONCEPTO.

De un modo general, podrían definirse como "xenobióticos" (etimológicamente: extraños o ajenos a la vida) aquellos compuestos cuyas características estructurales en cierto modo contrastan, o no guardan relación con la "normativa" que rige la dinámica bioquímica de la biosfera.

Las implicaciones de esta definición, ciertamente no demasiado precisa, han sido ampliamente debatidas, debates en los que, por el momento, no se ha llegado a un acuerdo general. Sin embargo, aun no siendo posible fijar de un modo estricto los límites del concepto, sí puede examinarse su grado de validez y juzgarse en términos aproximados su alcance.

Probablemente el único criterio satisfactorio a aplicar en tal caso sea el de la biodegradabilidad, y su nivel de aplicación el ecológico. Este modo de proceder se basa fundamentalmente en la siguiente consideración: cuanto más tardíamente haya aparecido, en el transcurso de la evolución, un determinado tipo molecular, menor número de entidades biológicas poseerán, evidentemente, el dominio de su biosíntesis y de sus mecanismos degradativos. En el extremo de la escala, muchas de las nuevas estructuras sintetizadas en las últimas décadas, a ritmo creciente, por el hombre, -

podrían no ser en absoluto susceptibles de experimentar procesos biodegradativos, o bien dichos procesos ocurrirían a través de mecanismos extremadamente lentos.

Una objeción es inmediata, y J. M. Bollag (1974) la explicita — en relación con el caso concreto de la acción microbiana sobre los plaguicidas — preguntándose si pueden -- existir realmente compuestos sintéticos resistentes a dicha acción, teniendo en cuenta que los microorganismos pueden -- poner en juego toda una serie de adaptaciones, tanto no-genéticas (fenotípicas) como mutacionales (genotípicas), con relativa facilidad. El mismo autor viene a responder a esta cuestión, del único modo en la actualidad posible, cuando -- afirma que "no hay duda de que ciertos grupos de plaguicidas resultan difícilmente atacables por los microorganismos, pudiendo permanecer en el medio durante considerables periodos de tiempo". Es claro que algo análogo podría decirse de otras muchas estructuras ampliamente difundidas hoy día en nuestro entorno.

Efectivamente, el fenómeno, tantas veces constatado en los últimos tiempos, de la acumulación de contaminantes de elevada persistencia en los tejidos de las especies que ocupan los eslabones superiores de las cadenas tróficas, demuestra, cuando menos, que la dilatada vida media residual de estas estructuras determina un manifiesto desajuste entre el ritmo de su ingreso en los ecosistemas y su tasa de degradación.

Podría añadirse que el propio desarrollo de mecanismos adaptativos, antes mencionado, puede llegar a convertirse --

precisamente -- como más adelante se comentará -- en uno de -- los más importantes factores de desajuste funcional, tanto a nivel de individuo como de población y ecosistema.

En cualquier caso, en relación con los compuestos xenobióticos no parece injustificado el referirse, como lo hace el citado Bollag, a una "recalcitrancia molecular intrínseca", aunque la evaluación precisa de tal propiedad exija -- unos conocimientos sobre el tema de la correlación entre estrutura química y biodegradabilidad muy superiores a los -- que por el momento se poseen.

II - DINAMICA DE LOS COMPUESTOS XENOBIOTICOS EN EL MEDIO AMBIENTE.

El ingreso de compuestos xenobióticos en el medio se produce a partir de muy diversos orígenes. Los desechos urbanos e industriales, junto con las aplicaciones de productos fito y zoosanitarios, constituyen sin duda las contribuciones de mayor significación.

Aunque desde ciertos puntos de vista cabría distinguir entre unas emisiones que, como las de desechos, no responden a una estrategia definida (más bien a una falta de estrategia), y la introducción de compuestos determinados con el propósito concreto de alterar de algún modo la dinámica espontánea de los sistemas naturales, en una óptica ecológica suficientemente amplia tales distinciones, así como las clasificaciones de contaminantes en base a criterios como su estado físico, el medio sobre el que inciden, fuentes emisoras, tecnologías correctoras, etc., resultan innecesarias. Las consecuencias son en cualquier caso las mismas: regresión del ecosistema afectado por favorecimiento de los componentes que basan su capacidad de competencia en la producción de un elevado número de descendientes.

Comoquiera que sea, los xenobióticos liberados en el medio quedan a disposición de una extensa gama de factores de orden físico, químico y biológico, cuya acción combinada tiende simultáneamente a su dispersión y a su degradación -

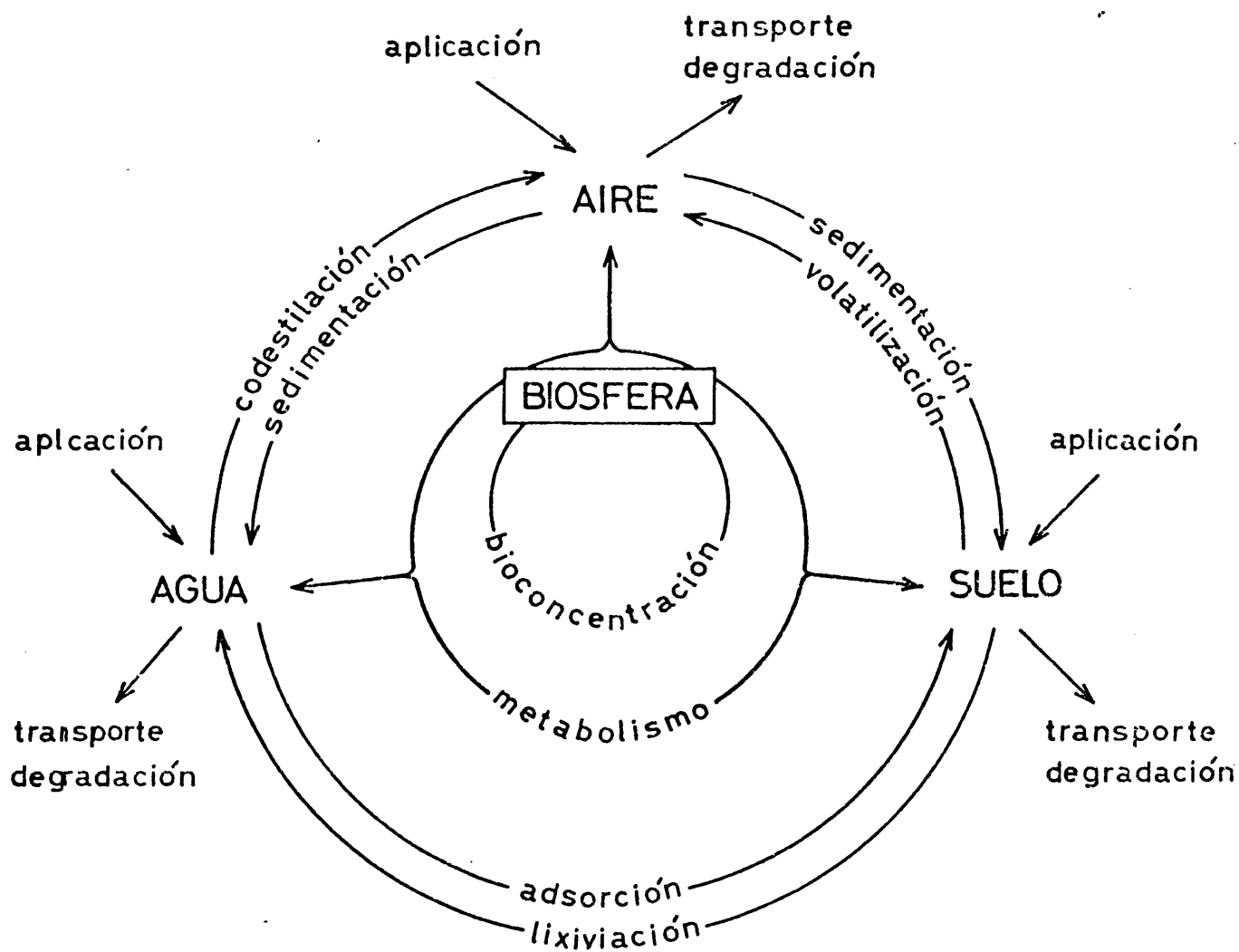


Fig. 1 - Dinámica de los compuestos xenobióticos en el medio ambiente.

(fig. 1). Las intensidades relativas de unos y otros procesos, evidentemente relacionadas con las peculiaridades topográficas, edáficas, climáticas, biosféricas, etc. del entorno en que se desarrollan, dependen, en primer término, de la estabilidad química del producto que se considere.

Cuando tal estabilidad es baja o moderada, muchos de los mecanismos transportadores pueden contribuir de un modo apreciable a su degradación. Las estructuras de elevada estabilidad, por el contrario, no solo son susceptibles de transferirse inalteradas o con leves modificaciones hasta sustratos muy alejados de su punto de ingreso, sino que, al entrar en las redes tróficas, tienden a concentrarse en los elementos consumidores de órdenes superiores, que al constituir también, por lo general, los que exhiben unas tasas de renovación más moderadas (es decir, son los más longevos), reciben un impacto comparativamente más intenso que los representantes de los niveles más inferiores de organización.

La figura 2, elaborada con datos relativos al insecticida organoclorado DDT, ilustra una importante consecuencia práctica de estos hechos: de igual modo que entre la liberación de un contaminante y la aparición de sus efectos a nivel ecológico media un periodo de latencia a veces muy prolongado, un análogo periodo "de retardo" transcurre entre el momento en que cesa la emisión y el cese de la sintomatología (prescindiendo de las posibles y esperables secuelas, que retardan aún más la recuperación de la situación inicial cuando ella es posible). Periodo cuya duración se dilata con la estabilidad del compuesto implicado y la elevación del nivel trófico considerado y que, en el caso parti-

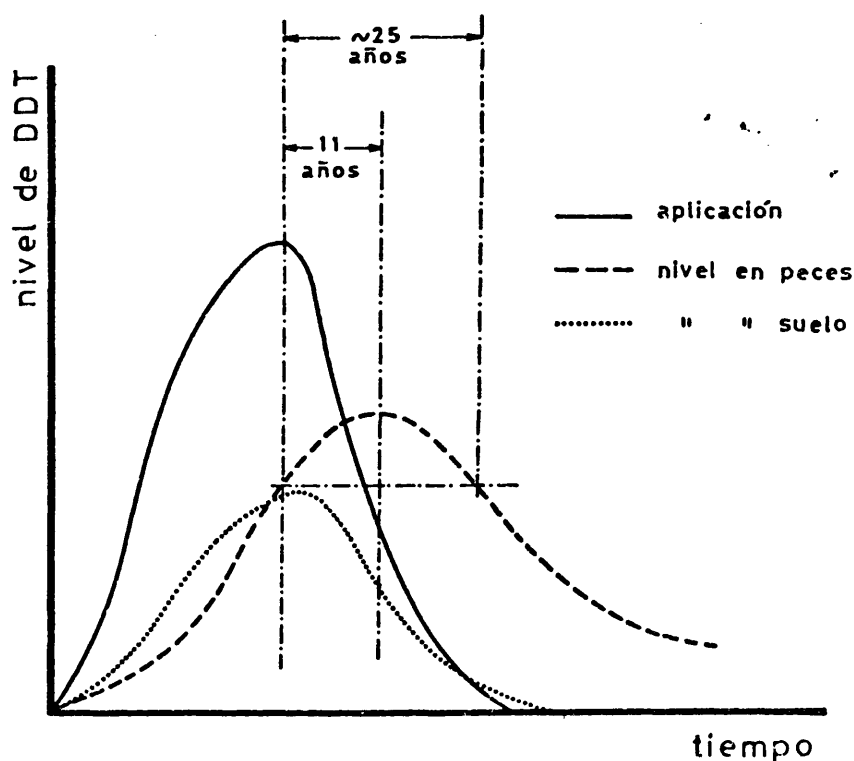


Fig. 2 - Retardos en la desaparición del DDT de diferentes compartimentos del ecosistema. Para explicación, véase el texto. (Según Randers, J. y Meadows, D.L. 1972).

cular aquí aludido, significaría que los efectos del DDT sobre los peces no solo no remitirían inmediatamente después de que la aplicación del insecticida comenzase a declinar, sino que se agudizarían, alcanzando un máximo de incidencia alrededor de 11 años después de aquel momento. Y únicamente transcurridos unos 25 años los niveles de DDT volverían a ser análogos a los presentes en el momento en que se inició la restricción de su ingreso en el medio.

No todos los mecanismos contribuyen en la misma medida a la degradación y desactivación de los compuestos xenobióticos. Entre los de orden físico la fotodescomposición es,

sin duda, el más relevante, ya que la fracción ultravioleta de la radiación solar es susceptible de alterar la configuración electrónica de los compuestos con enlaces . Apenas presenta interés si no es quizá como mecanismos que puedan facilitar otro tipo de acciones ulteriores, los efectos derivados de la separación mecánica, filtración, dilución e incluso elevación de la temperatura, puesto que aunque se habla de la termolabilidad de algunos plaguicidas, suele hacerse con referencia a temperaturas superiores a las que cabe aguardar en condiciones naturales. Y tan solo, dentro de este apartado, ciertos procesos físico-químicos vinculados a los fenómenos de adsorción de solutos sobre superficies sólidas, pueden contribuir a la desactivación de xenobióticos por bloqueo de determinadas porciones de sus moléculas, hecho del que se conocen varios ejemplos, particularmente entre ciertos grupos de herbicidas.

Es claro que las transformaciones de orden químico, -- esencialmente oxidaciones, reducciones, hidrólisis, descarboxilaciones, desclorhidraciones e isomerizaciones, desempeñan un papel más significativo. Con todo, es preciso tener en cuenta de nuevo que en la suavidad de las condiciones naturales -- temperaturas y presiones moderadas, pH próximo a la neutralidad --, incluso procesos tan conocidos como la -- desclorhidración del DDT en medio alcalino, o del lindano, o la epoxidación de compuestos ciclodiénicos tales como el aldrín, isodrín y heptacloro, no revistan, cuando se considera la vía estrictamente química, demasiada importancia -- cuantitativa.

Los mecanismos de índole bioquímica constituyen, con -

toda seguridad, la más interesante y significetiva contri--
bución a la transformación de los xenobióticos liberados al
medio. Y aunque en ocasiones alguno de los productos resul--
tantes coincidan con alguno de los que derivan de acciones
puramente físicas o químicas, es posible afirmar que, en la
inmensa mayoría de los casos, los ataques que tienen lugar
a través de procesos metabólicos son más veloces -- como co--
rresponde a reacciones catalizadas enzimáticamente -- sus --
productos abarcan un espectro mucho más amplio de variacio--
nes químicas, y en su transcurso se originan con mayor fre--
cuencia moléculas verdaderamente degradadas (entendiendo --
por degradación no la mera variación de un grupo funcional,
por mucha relevancia toxicológica que pueda poseer, sino el
acortamiento o desorganización del esqueleto carbonado de --
la molécula original).

Conviene tener en cuenta que no siempre la transforma--
ción, por la vía que sea, de los xenobióticos, lleva apare--
jada su desactivación o la pérdida de su peligrosidad. Cier--
tos procesos, por el contrario, exacerban la toxicidad del
producto original, elevan su estabilidad química o ejercen
ambos efectos -- como ocurre, por ejemplo, en el caso de la
epoxidación del aldrín para dar dieldrín -- . Cabe señalar, --
además, que entre los plaguicidas, existe un buen número de
estructuras diseñadas "ex profeso" con el fin de que su to--
xicidad se potencie o incluso surja, como consecuencia de --
transformaciones metebólicas que tienen lugar en el organis--
mo receptor o en su entorno.

Finalmente, vale la pena subrayar que mientras que la
desaparición de un xenobiótico sigue, cuando el proceso --

viene determinado por mecanismos físicos, fisico-químicos o químicos, una cinética de primer orden (fig. 3), la seguida cuando su transformación tiene lugar a través de mecanismos de índole biológica, es de tipo sigmoidal.

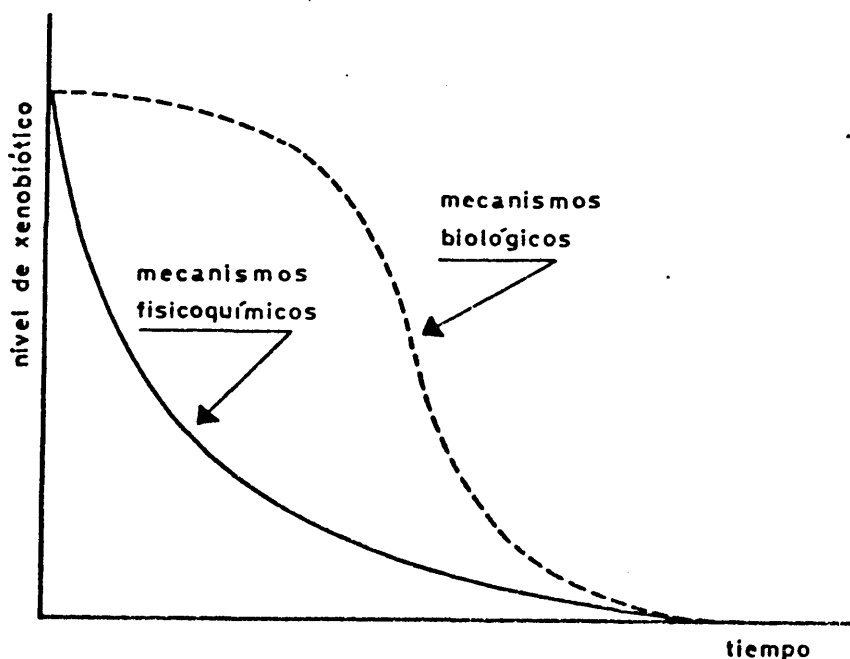
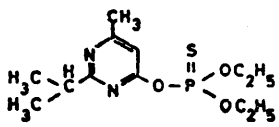
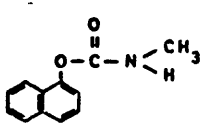
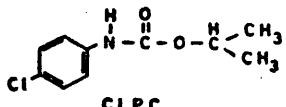
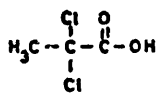
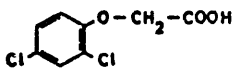
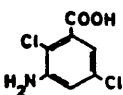
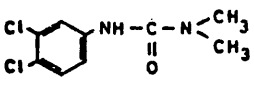
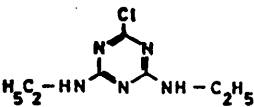
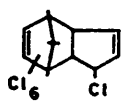


Fig. 3 - Cinéticas de desaparición de un contaminante subsiguientes a una sola aplicación. A: por mecanismos físicos o químicos. B: por mecanismos biológicos. (Según Kearney, P.C.; Nash, R.G. y Isensee, A.R. - 1969).

Es difícil, sin embargo, que, en condiciones naturales, puedan distinguirse claramente las contribuciones debidas a cada uno de los mecanismos señalados, los cuales no actúan, evidentemente, de modo independiente, sino cooperativo. En cualquier caso, constituye un hecho objetivo el que la permanencia de los xenobióticos en el medio, es decir, su grado de vulnerabilidad a la interacción de la totalidad de --

los factores considerados más atrás, varía entre amplios límites (Tabla I). Y quizá este dato constituya, al menos de momento, la medida más válida de la "recalcitrancia molecular intrínseca" de la que Bollag habla.

Tabla I - Persistencia y transformaciones enzimáticas de diversos grupos de plaguicidas en el suelo (Según J. M. Bollag, 1974)

GRUPO DE PLAGUICIDAS	EJEMPLO	PERIODO DE PERSISTENCIA EN SUELO	TRANSFORMACIONES ENZIMATICAS POR MICROORGANISMOS	
			Reacciones Primarias	Reacciones Secundarias
ORGANO-FOSFORADOS	 Diazinon	9 días	Hidrólisis.	Ruptura del anillo.
METIL-CARBAMATOS	 Carbaril	2-8 semanas	Hidroxilación, cadena lateral, hidroxilación anillo, hidrólisis.	Hidrólisis, ruptura del anillo.
FENIL-CARBAMATOS	 CIPC	7 semanas	Hidrólisis del ester.	Hidroxilación, ruptura del anillo.
ACIDOS ALCANOICOS HALOGENADOS	 Dalapon	2-8 semanas	Deshalogenación.	
ACIDOS CLOROFENOXI-ALCANOICOS	 2,4-D	4-14 semanas	β-Oxidación, ruptura del enlace eter, Hidroxilación en el anillo.	Hidroxilación en el anillo, ruptura del anillo.
ACIDOS BENZOICOS	 Amiben	6 semanas	Descarboxilación, deshalogenación.	
FENIL-UREAS	 Linuron	4-15 meses	N-Desalquilación, hidrólisis.	Hidrólisis, acetilación, condensación.
S-TRIAZINAS	 Simazina	18 meses	N-Desalquilación, deshalogenación.	Desaminación.
HIDROCARBUROS HALOGENADOS	 Heptachloro	9 años	Epoxidación, deshalogenación.	Hidrólisis.

III - METABOLISMO DE COMPUESTOS XENOBIOTICOS.

Tras las anteriores consideraciones, parece claro el interés de los estudios en torno a los procesos metabólicos en los que se encuentran implicados compuestos xenobióticos.

Un buen número de datos, así como valiosas orientaciones de índole metodológica procedentes de la farmacología y concernientes al metabolismo y modo de acción de drogas, proporcionan a aquellos estudios un estimable punto de partida. No hay duda, sin embargo, de que una aproximación a una toxicología ambiental — o a una farmacología ambiental — exige cubrir un área mucho más extensa y, en cierto modo, cualitativamente diferente.

Aun cuando la información utilizable a este respecto — en el caso del hombre y de algunos mamíferos alcance ya ——— unas notables proporciones, al descender a lo largo de la — escala animal, al pasar al reino vegetal y al considerar — los microorganismos — exceptuando tal vez un escasísimo número de especies "clásicas" —, muy poco es lo que se puede añadir. Finalmente, numerosos aspectos relativos al grado — de validez de la extrapolación a condiciones ambientales de los resultados obtenidos en las condiciones usuales de laboratorio, así como al significado y trascendencia a nivel — ecológico de los procesos descritos en organismos individuales o poblaciones monoespecíficas, permanecen todavía inexplorados.

En el caso de los microorganismos concurren, en este sentido, particularidades que merecen destacarse especialmente. En efecto, las metodologías más ampliamente extendidas para su estudio, se basan en la utilización de cultivos axénicos y cerrados, lo cual no sólo impide la investigación de la actividad combinada de varias especies, que es lo que constituye la situación habitual en condiciones naturales, sino que sitúa al microorganismo a estudiar en unas condiciones de desarrollo totalmente insólitas: la mayor -- parte de las observaciones que se registran en esta clase -- de experiencias conciernen a procesos que tienen lugar fundamentalmente en el transcurso de un periodo durante el -- cual los microorganismos objeto de ensayo crecen a ritmo exponencial en medios con elevadas proporciones de nutrientes.

No es ésta la cinética del crecimiento en las poblaciones naturales, donde, en situaciones normalmente mucho más complejas que la del cultivo puro, distintas especies -- sometidas, por otra parte, a la presión de parásitos y depredadores -- compiten entre sí por un suministro limitado de -- nutrientes. Ello determina, en primer lugar, una cinética -- alejada del modelo exponencial, pero, por añadidura, un estado metabólico característico, de baja tasa de cambio -- -- que a veces se califica impropriamente de "latente" y que más bien podría denominarse "basal" -- en el cual la velocidad de los procesos bioquímicos, y tal vez también su diversidad, se mantienen muy por debajo de los límites que acostumbra a manejarse en el laboratorio.

Puesto que según señala Brock (1973), el crecimiento -- microbiano en la naturaleza raramente es exponencial, pare-

ciéndose más a menudo al que tiene lugar en un quimiostato (quizá habría que añadir: un quimiostato funcionando a moderado flujo de nutrientes), éste debería constituir el medio de elección en los estudios sobre la naturaleza de las interacciones microorganismos - compuestos xenobióticos. Existen, por otra parte, datos que sugieren que los resultados obtenidos operando en regímenes continuos pueden presentar diferencias significativas respecto de los conseguidos mediante las metodologías convencionales.

Durante el desarrollo de este trabajo, por ejemplo, se encontró - según se describirá en la sección correspondiente - que en microorganismos desarrollados en cultivos cerrados adicionados con una única dosis inicial de bifenilos policlorados, la concentración de estos compuestos por unidad de peso seco de cosecha descendía gradualmente a lo largo - del periodo de incubación, es decir, a medida que aumentaba la biomasa. Al margen de las implicaciones que estos resultados puedan tener en relación con la naturaleza del proceso de acumulación, y aunque en el caso de microorganismos - filamentosos la situación quizá resulta más compleja, en -- cultivos de microorganismos unicelulares parece claro que las sucesivas generaciones de células se encontrarán expuestas a dosis cada vez más bajas, incluso en ausencia de mecanismos capaces de transformar el producto originalmente añadido. El dato de la concentración inicial, pues, sólo tendrá relevancia exacta en relación con la población celular inicial; esto es: el inóculo.

Aun fuera del terreno metodológico de la microbiología, existen asimismo datos a favor del anterior supuesto,

y así Nebeker y Puglisi (1974), en cultivos del crustáceo - *Daphnia magna*, llegan a encontrar que la concentración de - Aroclor-1254 (una mezcla de bifenilos policlorados) en el - agua que determina una mortalidad del 50% - CL_{50} - en tres semanas, es venticuatro veces mayor en régimen estacionario que en régimen continuo.

Es evidente, pues, que el empleo de las técnicas de -- cultivo continuo habrá de generalizarse a medida que se --- avanza en el campo de la toxicología ambiental. No cabe, -- sin embargo, dudar ya de la vigencia de procedimientos más convencionales, particularmente cuando existen aún numero - sos problemas que todavía no han sido abordados a través de ellos. El "enfoque de cultivo cerrado", por otra parte, permite amplificar ciertos efectos fisiológicos que, sin ser artefactuales, se acentúan en estados metabólicos caracte - rísticos de algunas etapas de tales cultivos, permite trabaja - ra en una dinámica cuyo ciclo es bien conocido y resulta de aplicación más sencilla - particularmente en el caso de mi - croorganismos filamentosos - que la que exige el trabajo en quimiostato.

Mientras que las interacciones entre compuestos xeno - bióticos y animales superiores se han comtenplado con cier - ta amplitud tanto desde el punto de vista de las transforma - ciones que experimenta la molécula extraña, como de los --- efectos que ésta determina sobre el organismo receptor, en el caso de los microorganismos se ha descuidado con excesi -

va frecuencia este último aspecto. Así, aunque se han caracterizado estructuralmente numerosos metabolitos resultantes de la acción microbiana sobre distintos tipos de xenobióticos, se sabe mucho menos acerca de sus formas de toxicidad, los factores que afectan a las vías transformadoras, y los desajustes que el propio proceso transformador puede inducir en los mecanismos fisiológicos de los microorganismos.

En general, el desarrollo de un microorganismo en presencia de un xenobiótico puede tener como consecuencia:

a) La mera acumulación -- ya sea en virtud de mecanismos activos o pasivos de transporte -- del xenobiótico, que permanece intransformado.

b) La transformación química del compuesto extraño, -- proceso que, a su vez, puede desarrollarse según dos modelos:

b₁) Sin que tal transformación lleve aparejado un aporte energético para la entidad transformadora. Es éste -- el fenómeno que Foster (1962) denominó "cooxidación", Jensen (1963) "cometabolismo" -- es tal vez el término más afortunado -- y Ruiz Herrera y Starkey (1969) "codesasimilación".

b₂) A través del ingreso del compuesto extraño en una vía catabólica esencial, con su correspondiente degradación química y, por lo tanto, el consiguiente aporte de --- energía.

Tal vez la ocurrencia de las dos primeras situaciones

mencionadas — acumulación del producto intransformado y --- transformación cometabólica — sea lo que mejor caracteriza a la dinámica de los compuestos típicamente xenobióticos en el medio ambiente.

Es claro que en el primer caso no tiene lugar un verdadero reciclado bioquímico del compuesto extraño, el cual estará en disposición de ejercer un efecto continuado sobre la entidad acumuladora y volverá a quedar libre cuando ésta se desorganice; pero tampoco el segundo constituye una situación usual en las moléculas de origen biosintético. Efectivamente, los procesos cometabólicos, al no suministrar -- energía — por el contrario, exigen una fuente adicional — son lentos, en muchos casos parecen necesitar de la presencia de un análogo estructural biodegradable de la molécula implicada y, por lo general, no parecen conducir a fragmentaciones demasiado enérgicas de ésta.

Desde el punto de vista de su contribución a los ciclos bioquímicos, es la tercera situación antes definida -- (b₂) la que constituye el caso de mayor relevancia. Es conveniente, no obstante, tener presente que numerosas reacciones conjugativas — las cuales deben incluirse en este apartado — tampoco significan la eliminación definitiva de una estructura tóxica. Por medio de la conjugación del xenobiótico intacto o ligeramente alterado con un compuesto endógeno (hidratos de carbono como el ácido glucurónico o aminoácidos o péptidos como el glutatión) la entidad biológica — que lleva a cabo el proceso eleva la hidrofilia del conjugante exógeno, facilitando su eliminación. Pero ulteriormente la conjugación puede destruirse con lo cual se pone de --

nuevo en movimiento la primitiva estructura.

Por otra parte, es evidente que al tratarse del metabolismo de compuestos cuya estructura no se da en la naturaleza, las enzimas implicadas en tales procesos son en muchos casos inducidas. Tales enzimas (aunque en ocasiones su denominación sugiere su "novedad", como ocurre en el caso de la DDT-asa) son, por lo común, las mismas que catalizan procesos metabólicos generales. Asimismo, las transformaciones - que los xenobióticos experimentan bajo su catálisis suelen ajustarse a modelos bioquímicos que también se dan en el metabolismo de compuestos endógenos.

Con todo, y ello constituye uno de los más importantes problemas que tienen planteados los estudios ambientales a nivel bioquímico, es posible que el mantenimiento de este tipo de procesos comporte descompensaciones metabólicas o -desequilibrios enzimáticos que lleven también a la mencionada situación b₂ a constituir una forma más de alteración de la dinámica bioquímica de la biosfera.

En líneas generales, el metabolismo de los compuestos xenobióticos tiene lugar a través de cuatro tipos de procesos básicos: oxidaciones, reducciones, hidrólisis y conjugaciones, cuyo resultado no siempre implica una detoxificación. A menudo las transformaciones de los tres primeros tipos, que suelen tender a elevar la hidrofilia, preparan a la molécula extraña para la conjugación con un componente endógeno de la entidad biológica transformadora.

Las oxidaciones constituyen tal vez el proceso más ge-

neralizado y, desde luego, el más investigado. De las cuatro categorías en que se suelen clasificar las enzimas implicadas en reacciones oxidativas — deshidrogenasas, oxidasas, dioxigenasas y monooxigenasas — son estas últimas las que, desde el punto de vista del metabolismo de compuestos xenobióticos, presentan un mayor interés.

Las monooxigenasas se caracterizan por participar en procesos en los que uno de los átomos del oxígeno molecular se trasfiere al sustrato, en tanto que el otro es reducido a agua por intermedio de un cofactor que actúa como transportador de electrones. Es precisamente su papel, en parte similar al de las oxidasas — en cuyo caso se reducen a agua ambos átomos del oxígeno molecular —, lo que les vale su frecuente denominación de "oxidasas de función mixta" (O.F.M.). También se conocen como hidroxilasas, ya que, por lo común, el sustrato cuya transformación catalizan queda hidroxilado, bien de forma definitiva o transitoria. Por su localización preferente, a nivel celular, en el retículo en doplásmico liso, se llaman a veces enzimas microsómicas y, finalmente, en la literatura anglosajona, particularmente en la bibliografía toxicológica, se alude a ellas como ---- "drug metabolizing enzymes", nombre indicativo de las causas por las que se les prestará atención en esta memoria.

Además de las peculiaridades que vienen reflejadas en la variada nomenclatura de las O.F.M., uno de sus aspectos más destacables, al menos en los mamíferos, consiste en su vinculación a una cadena de transporte electrónico (fig. 4) cuyo último eslabón, responsable al parecer de la activación del oxígeno molecular y de la transferencia de un áto-

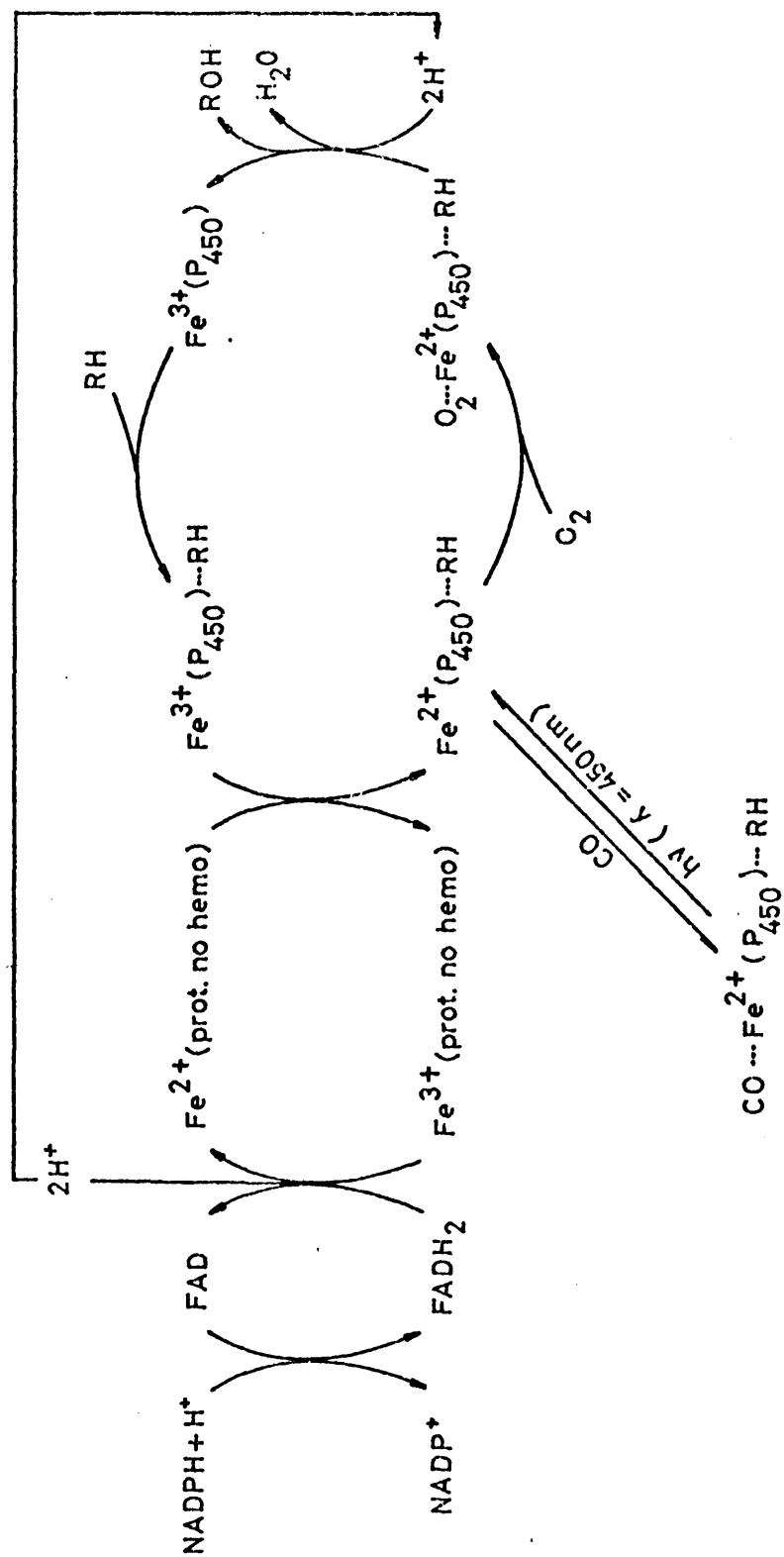


Fig. 4 - Cadena de transporte electrónico, vinculada al citocromo P-450 propia, generalmente, de sistemas O.F.M. microsomaes.

mo de éste al sustrato, es el citocromo P-450. Este citocromo es susceptible de formar, cuando se encuentra en estado reducido, complejos inactivos con el monóxido de carbono, - que muestran una fuerte absorción a 450 nm (propiedad en la que se basa su identificación espectroscópica) y que pueden reactivarse por irradiación a dicha longitud de onda.

También en base a datos fisiológicos obtenidos fundamentalmente en estudios llevados a cabo con mamíferos, se ha demostrado la amplia participación de las O.F.M. en el metabolismo de los lípidos, especialmente de los esteroides, actividad que se localiza muy preferentemente en el hígado y en la corteza de las glándulas suprarrenales. Pero mientras que las O.F.M. del córtex adrenal - que se han localizado tanto en microsomas como en mitocondrias - parecen encontrarse muy específicamente implicadas en el metabolismo de las hormonas esteroídicas, las O.F.M. hepáticas - localizadas exclusivamente en la fracción microsómica de los hepatocitos -, además de llevar a cabo la degradación de los esteroides endógenos, catalizando secuencias reactivas específicas, intervienen activamente en el metabolismo de un gran número de compuestos extraños, casos en los cuales las posiciones sobre las que inciden las transformaciones suelen ser poco específicas.

Por muy diversos procedimientos, entre los que se cuentan la determinación de los niveles de citocromo P-450, la velocidad de ciertas reacciones típicas - como la hidroxilación de la anilina y pentobarbital, la desmetilación de la metilanilina, etc. - de las que se conoce su catálisis por

drasa carbónica (enzima responsable de la liberación de calcio a nivel de oviducto en el momento de la puesta), inhibición que sólo se pudo probar en el caso del DDE. El problema esencial consiste en las escasas proporciones de calcio -- que, ya desde las primeras fases del ciclo reproductor, se depositan en la médula ósea de las aves afectadas. Dicho depósito, que en condiciones normales se moviliza en el momento de la puesta, viene controlado por el nivel de estrógenos circulantes, y habiéndose comprobado que tal nivel es -- muy inferior al normal en hembras dosificadas con diversos insecticidas organoclorados y PCBs, todo indica que es la síntesis inducida de O.F.M. lo que, al acelerar la degradación de los estrógenos, altera la totalidad de los pasos -- subsiguientes del metabolismo del calcio.

Es de lamentar que, por el momento, los conocimientos que se poseen sobre este tipo de interferencias en entidades biológicas distintas de los mamíferos y de las aves, -- resulten mucho más limitados, así como notablemente inconexos. Interesa, no obstante, destacar que se han encontrado indicios -- aunque no siempre directos -- de la inducción del citocromo P-450 en insectos bajo la acción de insecticidas (Ray, 1967; Brooks y Harrison, 1969; Hodgson et al., 1974) y de su presencia, con funciones análogas a las que asume -- en animales superiores, en bacterias (Katagiri et al., 1968). De otro lado, el paralelismo existente entre la biosíntesis de las hormonas giberelínicas en los vegetales y las esteroides en los mamíferos, se presta a sospechar analogías en los mecanismos detoxificantes a ambos niveles, aunque -- por ello, por el momento, sea únicamente motivo de especulación.

Finalmente, cabe mencionar que, en mamíferos, se ha de mostrado que las nitro y azoreducciones que determinados xe nobióticos experimentan bajo acción metabólica, quedan inhibidas por la presencia de monóxido de carbono. Ello sugiere la implicación del citocromo P-450 también fuera del metabolismo oxidativo, lo cual supondría una notable generalización de sus actividades detoxificantes, con las consecuencias que ello comportaría a nivel de implicaciones de la -- respuesta de los seres vivos a los compuestos xenobióticos.

Es de esperar que en los próximos años, nuevos estu-dios en torno a estos temas contribuyan a la clarificación de los conocimientos, hoy sólo embrionarios, que en la ac-tualidad parecen comenzar a configurar el campo de la toxi-cología ambiental.

IV - BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs). 1.- CARACTERISTICAS FISICAS, QUIMICAS Y TECNICAS.

Los PCBs constituyen una inmensa familia de compuestos — cuya molécula puede contener desde una hasta las diez clorosustituciones que su estructura permite — caracterizada por su notable estabilidad química. Son inertes, no oxidantes, no corroen los metales y resisten el tratamiento con ácidos, álcalis y agentes corrosivos. Insolubles — al menos a efectos prácticos — en agua y solubles en numerosos disolventes orgánicos, su estado varía desde el líquido al sólido, pasando por diversos grados de consistencia resinosa, a medida que se eleva el número de clorosustituciones. Inalterables a la calefacción prolongada a 150 ° C, son termoplásticos escasamente volátiles, destilan sin descomposición, — no mantienen la combustión a temperaturas inferiores a 360 ° C — comunicando propiedades retardatorias de la combustibilidad a otros materiales — y, eléctricamente, se comportan como no conductores.

Comoquiera que la intensidad con que se manifiestan todas las anteriores propiedades es función del número y posición de las clorosustituciones, variables que pueden recorrer un amplio intervalo, la utilización de mezclas de PCBs de diferente contenido en cloro permite graduar con facilidad tales propiedades y obtener diversas combinaciones de las mismas. Los PCBs constituyen, por ello, aparte de los casos en que se utilizan en forma "pura", aditivos de elec-

ción para numerosos materiales de muy diversas aplicaciones. Entre sus múltiples usos, caben destacar los desarrollados en los siguientes sectores:

a) Como lubricantes en sistemas de alto vacío o elevada presión. Como fluidos hidráulicos y de intercambio térmico. Como antiestáticos y aislantes en la industria electrotécnica. Como antiinflamables, particularmente en la industria de la celulosa y papel. Como impermeabilizantes, antihumectantes y agentes anticorrosivos.

b) Como aditivos en la industria de los materiales sintéticos, donde actúan como plastificantes y forman parte de gomas, ceras, resinas, masillas, materiales asfálticos, lacas, barnices, pinturas, tintas permanentes y de imprimir, mezclas grafitadas para el papel carbón, papeles para copias termográficas, papel de fibra de vidrio, papel de celofán, poliamidas, espuma de poliuretano, cloruro de polivinilo, adhesivos, etc.

c) Como aditivos en diversas formulaciones plaguicidas, fundamentalmente de DDT y lindano, pero también de otros, - incluso insecticidas organofosforados, donde pueden desempeñar el triple papel de dispersantes del principio activo, - estabilizadores que dilaten su vida media residual o agentes sinérgicos que potencien su actividad.

Los PCBs no se comercializan como compuestos puros, sino como mezclas en las que intervienen no sólo isómeros con el mismo contenido en cloro, sino también bifenilos de distinto grado de cloración. Varias firmas comerciales han re-

ción para numerosos materiales de muy diversas aplicaciones. Entre sus múltiples usos, caben destacar los desarrollados en los siguientes sectores:

a) Como lubricantes en sistemas de alto vacío o elevada presión. Como fluidos hidráulicos y de intercambio térmico. Como antiestáticos y aislantes en la industria electrotécnica. Como antiinflamables, particularmente en la industria de la celulosa y papel. Como impermeabilizantes, antihumectantes y agentes anticorrosivos.

b) Como aditivos en la industria de los materiales sintéticos, donde actúan como plastificantes y forman parte de gomas, ceras, resinas, masillas, materiales asfálticos, lacas, barnices, pinturas, tintas permanentes y de imprimir, mezclas grafitadas para el papel carbón, papeles para copias termográficas, papel de fibra de vidrio, papel de celofán, poliamidas, espuma de poliuretano, cloruro de polivinilo, adhesivos, etc.

c) Como aditivos en diversas formulaciones plaguicidas, fundamentalmente de DDT y lindano, pero también de otros, - incluso insecticidas organofosforados, donde pueden desempeñar el triple papel de dispersantes del principio activo, - estabilizadores que dilaten su vida media residual o agentes sinérgicos que potencien su actividad.

Los PCBs no se comercializan como compuestos puros, sino como mezclas en las que intervienen no sólo isómeros con el mismo contenido en cloro, sino también bifenilos de distinto grado de cloración. Varias firmas comerciales han re-

gistrado, para las mezclas de PCBs de su producción, distintas denominaciones, en las que una clave numérica convencional que se añade a un nombre arbitrario, indica la proporción media de cloro contenida en la mezcla. Este proceder no responde a otra realidad que la mercantil, y así, por ejemplo, Aroclor-1260, Phenochlor-DP6, Clophen-A60 y Kanechlor-KC600 son mezclas de bifenilos con un 60% de cloración, formadas esencialmente por los mismos componentes y comercializadas por las entidades Monsanto (Canada y E.E. U.U.), Prodelec (Francia), Bayer (Suiza) y Kanegafuchi (Japón), respectivamente.

A lo largo de este trabajo se han utilizado las mezclas designadas como A(roclor)-1232, A-1242, A-1248, A-1254 y A-1260. Los dos últimos dígitos de la clave numérica indican el contenido medio en cloro de cada mezcla, en unidades porcentuales (es decir 32, 42, 48, 54 y 60% respectivamente).

No todos los PCBs teóricamente posibles participan igualmente en la composición de las mezclas comerciales.

Es claro que el número de los teóricamente posibles se obtiene efectuando todas las combinaciones químicamente diferentes que permiten dos anillos bencénicos que pueden contener hasta 5 átomos de cloro cada uno. Cada anillo, en estas circunstancias, permite 20 combinaciones (tabla II) y, en la combinación de dos anillos, cabe considerar dos casos:

a) Igual número de átomos de cloro en ambos anillos: siendo n el número de isómeros que pueden formarse a partir

Tabla II - Número de n-clorobencenos posibles (n entre 0 y 5).

Nº de át. Cl/anillo	Nº de isómer.	Clorosustituciones
0	1	---
1	3	2 / 3 / 4.
2	6	2,3 / 2,4 / 2,5 / 2,6 / 3,4 / 3,5.
3	6	2,3,4 / 2,3,5 / 2,3,6 / 2,4,5 / 2,4,6 / 3,4,5.
4	3	2,3,4,5 / 2,3,4,6 / 2,3,5,6.
5	1	2,3,4,5,6.

de las clorosustituciones de cada anillo, y teniendo en --- cuenta las redundancias que se producen al ser equivalentes ambos anillos, el número de PCBs posibles en este caso es:

$$N_1 = n + (n-1) + (n-2) + \dots + 1 = \frac{n(n+1)}{2}$$

b) Diferente número de átomos de cloro en cada anillo: siendo n_A el número de isómeros que permiten las clorosustituciones que contiene el anillo A y n_B los isómeros correspondientes al anillo B, el número de PCBs en este caso es, simplemente:

$$N_2 = n_A \cdot n_B$$

Así pues el número total de PCBs posibles es, según se detalla en la tabla III, de 209. De ellos, los más usuales a nivel industrial son los que poseen un grado de cloración correspondiente a una media de 5 átomos de cloro por molécula.

Tabla III- Nº total de PCBs posibles (los encerrados en doble cuadrícula corresponden a las moléculas más usuales).

		nº de Cl en anillo A					
		0	1	2	3	4	5
nº de Cl en anillo B	0	1	3	6	6	3	1
	1		6	18	18	9	3
	2			21	36	18	6
	3				21	18	6
	4					6	3
	5						1

la (es decir, un 58,6% como término medio). Más raras son las moléculas que contienen menos de cuatro o más de ocho átomos de cloro, límites entre los cuales, por otra parte, las estructuras más probables (Jensen, 1968) son aquellas - en las que la diferencia entre el número de átomos de cloro en cada anillo no exceda la unidad. En este caso se encuentran las 102 estructuras encerradas por la doble cuadrícula, en la tabla III, y que, por consiguiente, serán las de mayor interés en cuanto a lo que su problemática ambiental se refiere.

V - BIFENILOS POLICLORADOS. 2.- ASPECTOS ESTRUCTURALES SUSCEPTIBLES DE AFECTAR SU DINAMICA BIOQUIMICA. PROBLEMATICA TOXICOLOGICA Y AMBIENTAL.

Es claro que la dinámica bioquímica de los PCBs — como la de cualquier otro tipo de compuestos xenobióticos — será una resultante de su penetrabilidad a través de las membranas biológicas, de la naturaleza de las interferencias que provoquen y las respuestas que determinen en los seres vivos y de su susceptibilidad al ataque de los sistemas enzimáticos de que aquellos disponen.

Ninguno de estos aspectos se encuentra, hasta el momento, lo suficientemente pormenorizado como para permitir --- unas generalizaciones convincentes en torno al problema de las correlaciones estructura química- actividad biológica- biodegradabilidad en este tipo de compuestos.

Es frecuente atribuir esta carencia, así como la escasa coherencia de los datos toxicológicos disponibles, a las dificultades que plantea el no trabajar con compuestos puros, sino con mezclas de análogos estructurales. El mismo hecho, sin embargo, de que la mayoría de los trabajos en este campo estén siendo llevados a cabo con tales limitaciones, harto conocidas, parece indicar que es el planteamiento de base de estos estudios lo que no se lleva a las coordenadas aparentemente más convenientes para acceder a la anterior categoría de resultados.

Cabría añadir, por otra parte - y éste es, tal vez, el factor más importante - que las formas de toxicidad asociadas a los PCBs resultan, en cualquier caso, bastante difusas. No son, en efecto, directa ni exclusivamente vinculables a la intensa inhibición de ninguna enzima conocida, ni al bloqueo drástico de algún paso metabólico concreto, lo cual nos aparta de las casuísticas toxicológicas más "clásicas". Y convendría tener presente que en el ejemplo, cercano, de los insecticidas órganoclorados - entre los cuales - se encuentran estructuras como la de los clorodifeniletanos, emparentadas con los PCBs - tampoco se ha llegado por el momento, pese a las numerosas aproximaciones "ortodoxas" al tema, a una explicación concreta y satisfactoria de su actividad biológica.

Con todo, es posible elaborar una serie de conjeturas en relación con los PCBs que, cuando menos, no dejan de presentar validez como hipótesis de trabajo.

En primer lugar, es en teoría perfectamente aceptable que la penetrabilidad, función de la lipofilia de la molécula penetrante, aumentará con el número de clorosustituciones. El tamaño molecular de los PCBs no debe permitir la entrada en juego de factores que modifiquen esta situación, y tampoco es lógico esperar que la hipotética intervención de mecanismos de transporte activo la alteren sustancialmente.

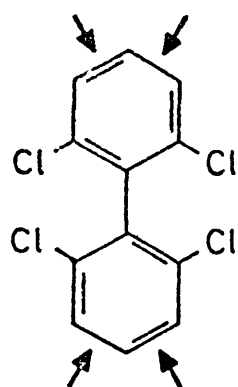
Es posible que la correlación entre biodegradabilidad y grado de cloración no resulte ya tan directa. Efectivamente, según han sugerido Schulte y Acker (1974), la suscepti-

bilidad de los PCBs a las acciones metabólicas capaces de - degradar - o poner en disposición de degradar - su molécula, exigen al menos la presencia de dos átomos de carbono adyacentes insustituídos, hipótesis que, al menos en relación - con animales superiores, ha sido parcialmente demostrada por Jensen y Sundström (1974).

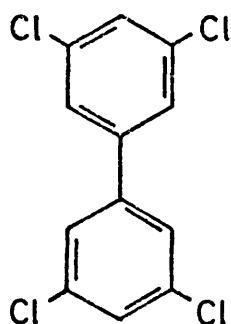
En tal caso, dos estructuras tetracloradas como la I y la II de la fig. 5 presentarían notables diferencias en cuanto a su biodegradabilidad, ya que mientras la primera ofrece cuatro posibles puntos de ataque, la segunda no ofrece ninguno. Incluso ocurriría que estructuras tetracloradas como la II resultarían más resistentes que otras penta- hexa- y heptacloradas (III, IV, V y VI). Y quizá también que aun estructuras con el mismo número de clorosustituciones y puntos de ataque (III y IV, por ejemplo) mostrasen diferente grado de vulnerabilidad debido a la localización sobre el mismo o diferente anillo de tales puntos.

Finalmente, cabe referirse a la posibilidad, no desconocida en otros xenobióticos de estructura más o menos relacionada, de que el grado de coplanaridad de los dos anillos afecte la actividad biológica de la molécula o / y su biodegradabilidad. De nuevo, en tal caso, la posición relativa de las clorosustituciones podría jugar un papel esencial.

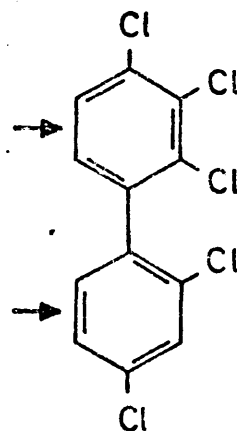
En efecto, es sabido que la molécula de bifenilo, coplanar en el cristal porque el efecto de empaquetamiento se suma a la tendencia a la coplanaridad por el efecto resonante, en fase gaseosa establece un compromiso entre esta última tendencia y las interacciones entre los hidrógenos en or-



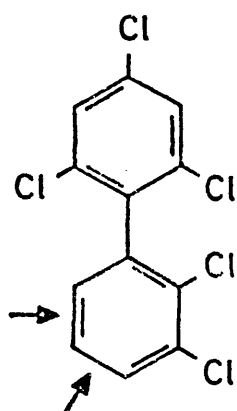
I



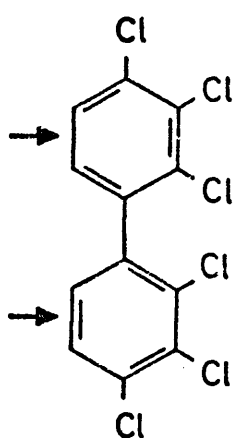
II



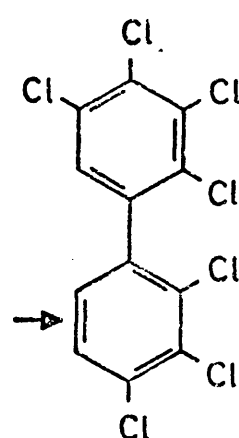
III



IV



V



VI

Fig. 5 - Influencia del número y posición de las clorosustituciones en la susceptibilidad de los PCBs a la hidroxilación microsómica. Para explicación, véase el texto.

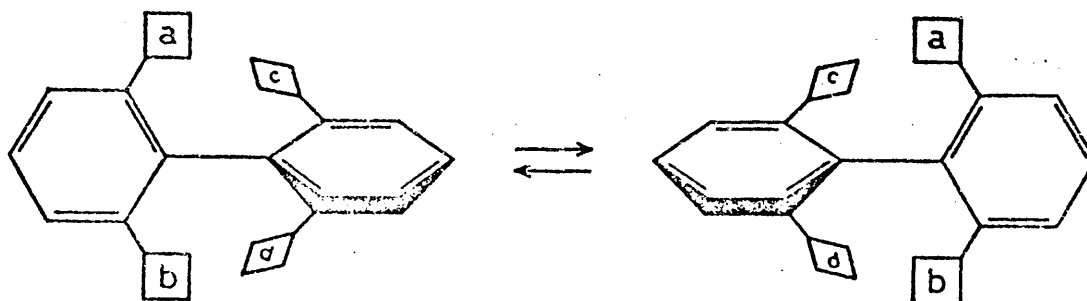


Fig. 6 - Enantiomería en bifenilos sustituidos. Si los ortosustituyentes son poco voluminosos, la barrera de interconversión de los enantiómeros es muy pequeña y ambas formas están en equilibrio. Si son voluminosos, el paso por la coplanaridad estará impedido y no podrá tener lugar la interconversión.

to, que, más cercanos entre sí que la suma de sus radios de van der Waals, tenderían a producir un giro de 90° (el compromiso se resuelve en un giro de 42°).

Evidentemente, la sustitución de los hidrógenos en orto por átomos o grupos más voluminosos elevaría el grado de interferencia, por lo que, aun prescindiendo del papel que, en solución, jugaría la naturaleza del disolvente, es claro que en los PCBs y sus posibles metabolitos puede darse toda una amplia gradación en el ángulo interanular, con existencia de formas enantioméricas más o menos fácilmente interconvertibles (fig. 6), problemática cuya incidencia a nivel de actividad biológica no ha sido todavía investiga-

da adecuadamente.

Pero incluso aspectos más "clásicos" de la toxicología de los PCBs permanecen en la actualidad confusos, existiendo, sobre muchos de ellos, referencias en extremo contradictorias.

En general, y aunque son extremadamente escasas las citas que proporcionan valores concretos para las DL_{50} , parece admitido que su toxicidad aguda es algo más baja que la de los insecticidas organoclorados más usuales hace unos - años (y cuya aplicación, hoy día, se encuentra legalmente restringida en muchos países), aunque por ser muy notable frente a peces, crustáceos y moluscos, es obvia su peligrosidad como contaminantes acuáticos (Wildish, 1970; Duke et al., 1970; Hansen et al., 1971). De otro lado, al tratarse de tóxicos acumulativos, es claro que los aspectos más re-levantes de su problemática en este sentido deben encontrarse en el estudio de los efectos debidos a exposiciones cró-nicas.

En este campo, parece fuera de toda duda, como ya se comentó en un capítulo precedente, la correlación existen-te entre el decaimiento de ciertas poblaciones silvestres, en particular de aves, y sus niveles de PCBs en tejidos, - proceso que, según todas las evidencias, tiene su origen en la capacidad de estos xenobióticos para la inducción de en-zimas microsómicas, inducción que asimismo parece desempeñar un papel destacado en los efectos crónicos de aquellos compuestos sobre los mamíferos (Street et al., 1969).

En estos trabajos se encuentra, por lo general, que la intensidad del efecto biológico aumenta correlativamente al contenido medio en cloro de la mezcla de compuestos ensayada, resultados que concuerdan con los de Bitman y Cecil -- (1970) en su estudio sobre la actividad estrogénica de una serie de Aroclor sobre la rata; pero discrepan de los obtenidos en otros diversos estudios (Lichtenstein et al., 1973; Sivalingam et al., 1973 y Hawes et al., 1976, entre otros).

Asimismo, aunque Lincer y Peakall (1970) encuentran - que el incremento en el metabolismo del estradiol por efecto de los PCBs corre parejo al aumento de los niveles citoplásmicos de RNA, los resultados de Keil et al. (1971), aunque en relación con otras entidades biológicas - lo cual podría explicar el desacuerdo -, muestran como el Aroclor - 1242 deprime significativamente los niveles relativos de - RNA.

Con el fin de obviar, al menos en parte, los problemas de este confuso panorama y no hacer absolutamente incompatibles resultados de elevada fiabilidad pero aparentemente contradictorios, Peakall y Lincer (1970) han sugerido -- que mientras los efectos letales de los PCBs se encuentran inversamente correlacionados con su contenido medio en cloro, los efectos subletales lo están directamente. Tampoco esta teoría, sin embargo, explica satisfactoriamente la totalidad de las constataciones empíricas recogidas hasta el momento.

Cabe destacar, en relación con los efectos patológicos de los PCBs sobre animales superiores - aves y mamífe-

ros - que, aunque en ambos casos se han evidenciado fenómenos de inducción enzimática más o menos paralelos, los trastornos concomitantes, en las primeras, se localizan preferentemente en pericardio, riñón y bazo, mientras que en los segundos afectan muy particularmente al hígado. De otro lado, existen diversas referencias relativas a cuadros clínicos de insuficiencia hepática, atrofia del córtex cerebral y anomalías electroencefalográficas en pacientes humanos que habían experimentado exposiciones crónicas a tales compuestos.

La correcta evaluación toxicológica de los PCBs tropieza finalmente con la dificultad de que las mezclas comerciales utilizadas en su estudio - además del problema, ya mencionado, que representa el solo hecho de que se trate de mezclas - pueden contener trazas de impurezas (usualmente coo productos de síntesis) como los policlorodibenzofuranos y - policlorodibenzodioxinas (I y II respectivamente en la fig. 7), compuestos de extremada incidencia tóxica, cuyos efectos solapan en ocasiones con los producidos específicamente por los PCBs.

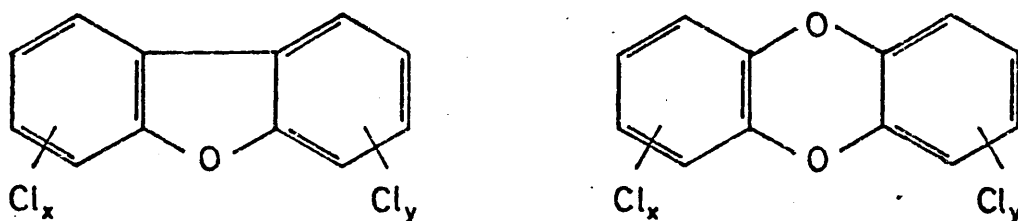


Fig. 7 - Policlorodibenzofuranos (I) y policlorodibenzodioxinas (II).

Vos y Koeman (1970), por ejemplo, comparando las toxicidades de tres mezclas comerciales de PCBs manufacturados por distintas firmas, aunque todas ellas con un contenido medio en cloro del 60 % (Phenoclor DP-6, Clophen A-60 y Aroclor-1260) encontraron que, frente al pollo, los dos primeros exhibían una toxicidad significativamente más acusada - que el tercero. Estudios posteriores (Vos et al., 1970) confirmaron, valiéndose de la espectrometría de masas, que tales diferencias se debían a la presencia, en los más tóxicos, de proporciones comprendidas entre las 5 y las 20 ppm de tetra- y pentaclorodibenzofuranos, impurezas ausentes en el Aroclor-1260, al menos por encima del límite de detección de 1 ppm.

Con respecto al metabolismo de los PCBs, los datos en la actualidad disponibles, si bien en líneas generales revelan la notable resistencia de estos xenobióticos ante la acción de los seres vivos, resultan todavía insuficientes. Diversos trabajos llevados a cabo sobre este tema (Koeman et al., 1969; Grant et al., 1971) coinciden en señalar, sobre la base de las variaciones que, con respecto al perfil cromatográfico de la mezcla administrada, muestran los de extractos de tejidos de los animales dosificados, que son los componentes de más bajo contenido en cloro los más susceptibles. No se detectan ni se describen, sin embargo, metabolitos, ni se cuantifica el grado de transformación de la dosis original.

Más explícitos en este sentido son los estudios de Moza et al. (1974), sobre el metabolismo del 2,2'-diclorobifenil-

lo en un sistema plantas - agua - suelo, así como los de - Greb et al. (1975), implicando al 2,4'- diclorobifenilo y 2,5,2'- triclorobifenilo frente al Macacus rhesus. En ambos casos se constata la formación de metabolitos hidroxilados, señalándose asimismo, en el primero de ellos, la posibilidad de que se produzcan también derivados parcialmente desclorados. En el segundo se subraya que aunque en los bifenilos con bajo contenido en cloro, como los ensayados, la hidroxilación y subsiguiente excreción parecen tener lugar con relativa rapidez, el proceso se hace más lento y dificultoso a medida que se eleva el porcentaje de cloración.

Todos los estudios llevados a cabo hasta el momento sobre distribución tisular de los PCBs indican, como era de esperar dadas sus características de solubilidad, su tendencia a acumularse preferentemente en los tejidos ricos en lípidos.

En diversos trabajos realizados sobre especies silvestres - fundamentalmente de aves - con ocasión de mortalidades concentradas en breves espacios de tiempo, las correlaciones halladas entre niveles residuales de PCBs en distintos tejidos y muerte, sólo resultan significativas cuando el tejido implicado es el nervioso (cerebro). Son, sin embargo, altamente significativas, como ya se comentó, las correlaciones entre disfunciones crónicas que hacen descender las tasas de natalidad en poblaciones de aves y niveles residuales globales de PCBs.

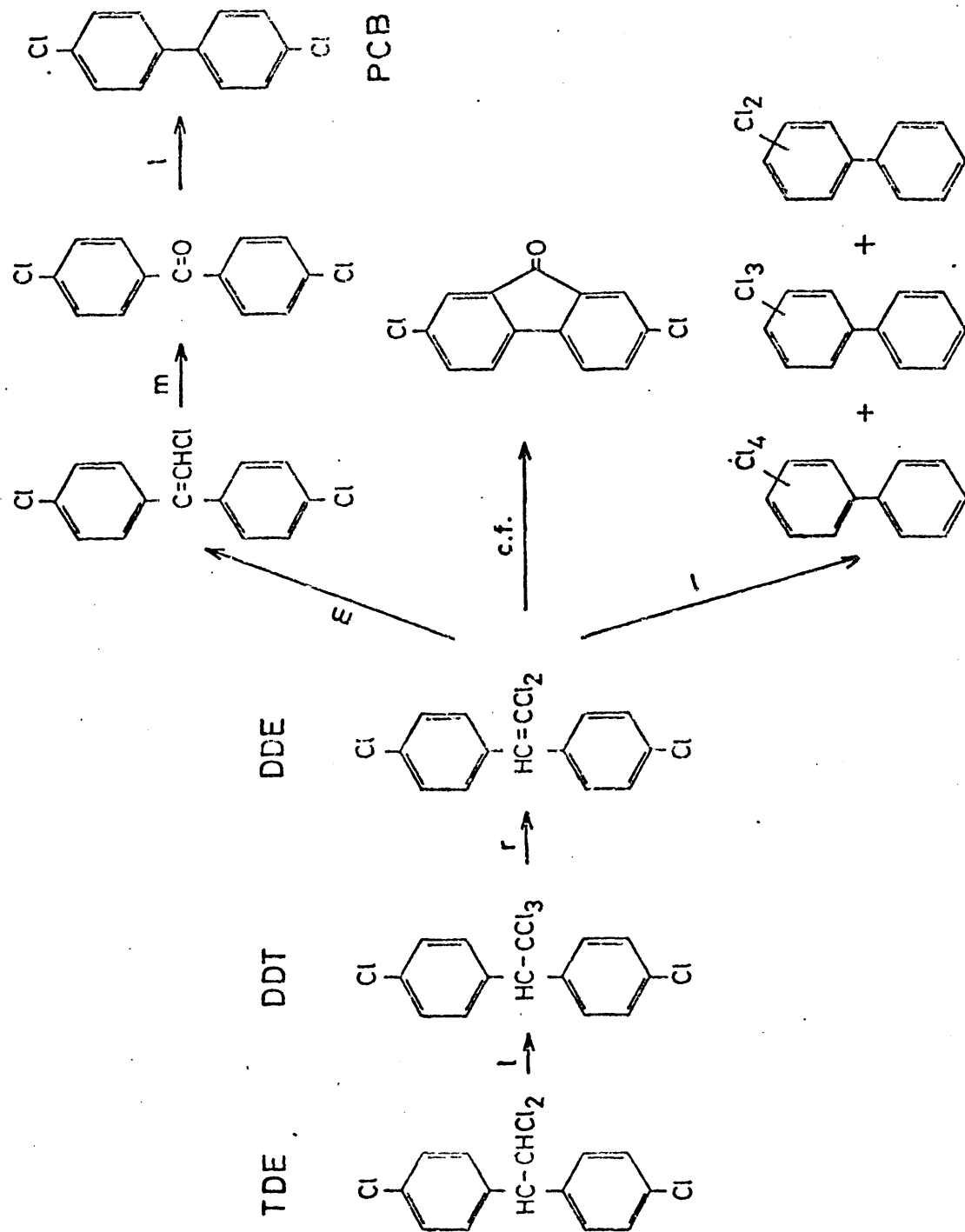
La información disponible es contradictoria en lo que

se refiere a la participación o ausencia de mecanismos de - transporte activo o facilitado de estos xenobióticos hacia el espacio intracelular, problema que reviste un especial - interés en relación con los microorganismos.

Poco cabe añadir, después de las consideraciones precedentes, sobre la problemática ambiental de los PCBs. Desde su introducción en 1929, estos compuestos han alcanzado un grado de difusión como contaminantes ambientales que ha superado incluso al de los insecticidas organoclorados.

En 1966, Jensen identificó como PCBs, calificándolos - por vez primera como "un nuevo riesgo químico", a los compuestos responsables de una serie de interferencias que surgen con frecuencia en la determinación de residuos insecticidas organoclorados por cromatografía de gas-líquido. A partir de esta fecha se multiplicaron abundantemente las constataciones de su presencia en los más diversos sustratos - - incluidos los tejidos humanos -, siendo cada vez más frecuentes los casos en que sus niveles representan la fracción mayoritaria del total de contaminantes organoclorados detectados en las muestras estudiadas.

A las múltiples vías de ingreso en el medio que, por la amplitud de sus utilizaciones, encuentran, debe sumarse, según una reciente sugerencia (fig. 8), la posibilidad de que los residuos de DDT y otros clorodifeniletanos constituyan, por efecto de la luz solar en las capas bajas de la atmósfera, una nueva fuente de PCBs (Moilanen y Crosby, 1973). Resulta asimismo plausible que la combustión incompleta c a -



PCBs

Fig. 8 - Fotoconversión de DDT (vapor) en PCBs a la luz solar en la baja atmósfera. (Según Mcilanen y Crosby, 1973). l: lento, r: rápido, m: moderado, c.f.: capa fina.

insuficiente temperatura de materiales que contengan PCBs dé como resultado la liberación de policlorodibenzofuranos y policlorodibenzodioxinas, originando formas de contaminación que, dada la extremada toxicidad y la estabilidad de - estos compuestos, revestirían una considerable gravedad.

Es muy probable que, dadas sus características físicas, químicas, técnicas y toxicológicas, los PCBs constituyan, en la actualidad, los xenobióticos más ubicuos y de más complejas implicaciones.

VI - ENFOQUE Y JUSTIFICACION DEL PRESENTE TRABAJO

Por su posición y papel dentro de los ciclos biogeoquímicos, el suelo constituye - junto con las aguas continentales y, sobre todo marinas - un sustrato particularmente favorable al depósito y acumulación de productos de larga vida residual, entre los cuales, como se ha visto, los PCBs - ocupan un lugar destacado.

Parece evidente, pues, que el estudio de las interacciones entre estos xenobióticos y la microflora edáfica, -- pese a que, por el momento, ha recibido una atención relativamente escasa, ofrece un especial interés, tanto desde el punto de vista de las posibles transformaciones que experimenten aquellos compuestos, como de las repercusiones que -- puedan tener sobre los microorganismos.

Sobre estas premisas, en la planificación de este trabajo se centró la atención sobre microorganismos del tipo - Ascomicetos , por dos razones fundamentales:

a) Los hongos del suelo se caracterizan por una permeabilidad escasamente selectiva frente a las sustancias presentes en su medio, mostrando, por otra parte, una alta capacidad metabólica frente a muy diversos sustratos.

b) En los procesos naturales de degradación de hidro -

carburos, suele ser precisamente la microflora fúngica la responsable de los primeros pasos metabólicos.

Así pues, el cultivo de diversos Ascomicetos en medios sólidos y líquidos dosificados con concentraciones variables de PCBs de diferentes porcentajes medios de cloración, proporcionó los primeros materiales para el estudio del proceso de acumulación del xenobiótico, la constatación de su resistencia al ataque metabólico de los microorganismos ensayados y una aproximación cuantitativa a sus efectos tóxicos sobre los mismos.

En este punto, y como suele ocurrir cuando se avanza en el desarrollo de un plan de investigación, se cerraron ciertos caminos al mismo tiempo que se abrieron nuevas posibilidades. Así, el estudio más o menos detallado — que se preveía — en torno a las rutas y cinética de los mecanismos de biotransformación de los PCBs, perdió su sentido al comprobarse la inexistencia de tales mecanismos. Paralelamente, los resultados de esta primera fase pusieron de manifiesto la complejidad de los aspectos toxicológicos implicados en la acción de los xenobióticos, lo cual pasó a reclamar la atención preferente del desarrollo experimental posterior.

La valoración de diversos componentes celulares con --vistas a la cualificación y cuantificación de alguno de ---aquellos aspectos llevó a la constatación de los efectos de los PCBs sobre la biosíntesis de RNA, lo cual, a su vez, condujo a la investigación del posible papel de los mecanismos

de inducción enzimática en la respuesta del Aspergillus flavus a los tóxicos ensayados, así como de su repercusión sobre el metabolismo, "in vivo" e "in vitro", de otros xenobióticos.

Simultáneamente, los resultados obtenidos en el estudio de los intercambios de gases en esporas germinantes de aquel Aspergillus, en presencia de los diferentes Aroclor, sugirieron la utilidad de extender el trabajo a la levadura Saccharomyces cerevisiae.

En efecto, si bien esta última especie no puede considerarse un microorganismo del suelo, no se encuentra excesivamente alejada de otras levaduras que, siéndolo, no ofrecen la ventaja que, en Saccharomyces, representa el hecho de disponerse de numerosas cepas con una diferenciación gradual en las contribuciones de mecanismos fermentativos y respiratorios a su metabolismo energético.

La comparación entre los efectos de los PCBs sobre este microorganismo en ambas situaciones metabólicas y su influencia sobre la actividad de transporte electrónico sirvió, finalmente, para ensayar una interpretación de su actividad en relación con el funcionamiento de las cadenas respiratorias.

Evidentemente, no todas las respuestas que en esta memoria se dan a los problemas planteados en los campos que sumariamente acaban de enumerarse, poseen el mismo valor, ni son igualmente definitivas. Bien establecidas algunas, -

creemos que el interés de otras consiste precisamente -- y -- en esta forma se han descrito -- en su capacidad de convertirse en nuevas hipótesis de trabajo.

"B" - P A R T E

E X P E R I M E N T A L

B.I - M E T O D O L O G I A

Y

M A T E R I A L E S

1 - TECNICAS DE CULTIVO.

Para el desarrollo de Aspergillus flavus se utilizó medio de Czapek :

Sacarosa	30	g
NaNO ₃	2	"
K ₂ PO ₄ H	1	"
MgSO ₄	0,5	"
FeSO ₄	0,01	"
KCl	0,5	"
H ₂ O destilada	1000	ml

El cultivo de Saccharomyces cerevisiae se llevó a cabo en dos tipos de medios. Uno fermentable compuesto por :

Extracto de levaduras	10	g
NaCl	0,5	"
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,7	"
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2	"
CaCl ₂	0,1	"
KPO ₄ H ₂	1	"
FeCl ₃	0,005	"
Glucosa	10	"
H ₂ O destilada	1000	ml

Y otro no fermentable, que se diferencia del anterior únicamente en que la glucosa se sustituye por etanol al 3% (p / v).

La esterilización se efectúa en autoclave a 1 atmósfera (121 ° C) durante 15 minutos.

Para los cultivos en medio líquido se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, conteniendo 50 ml de solución. El inóculo consiste en 0,25 ml de una suspensión de esporas (A. flavus) o células (S. cerevisiae) en agua - destilada estéril con un 0,1% de TWEEN-20. La concentración del inóculo se ajusta por dilución, realizándose la enumeración por el método del conteo directo mediante una cámara hematocitométrica.

Los cultivos sobre medios sólidos - que se preparan -- por agarización al 2% de los medios líquidos correspondientes - se llevan a cabo en placas Petri de tamaño variable, en consonancia con la experiencia a realizar, consistiendo el inóculo en 0,01 ml / cm² de una suspensión de esporas o células análoga a la descrita para los cultivos en medio -- líquido.

La incubación se prolonga a lo largo de periodos diferentes según los casos, a una temperatura de $29 \pm 2^\circ \text{C}$. Los cultivos en medio líquido se mantienen en agitación constante (80 ciclos/min) a fin de facilitar la aireación.

1.1 - INCORPORACION DE LOS PCBs Y OTROS ORGANOCLORADOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Las mezclas de bifenilos policlorados ensayadas fueron las comercializadas bajo las denominaciones de Aroclor-1232, 1242, 1248, 1254 y 1260 por la casa Monsanto. La ausencia -- en estos preparados (Vos y Koeman, 1970) de impurezas de -- elevada actividad biológica -- policlorodibenzofuranos -- obvia el problema de la interferencia de efectos tóxicos.

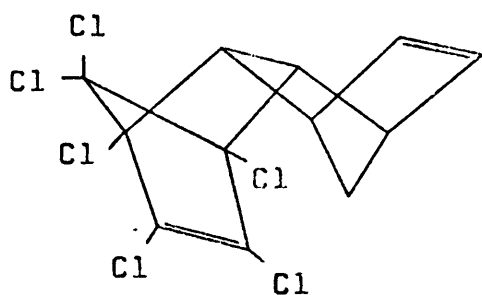
La baja solubilidad en agua de estos productos dificulta su incorporación a los medios de cultivo, por lo que, pese a que algunos autores sugieren la conveniencia de no utilizar disolventes ni emulsificantes en este tipo de experiencias, hubo de recurrirse, para la adición de los PCBs a medios acuosos con un adecuado grado de homogeneidad, al empleo de los primeros.

Así pues, todos los Aroclor ensayados se incorporaron asépticamente a los medios líquidos, después de su esterilización y antes de proceder a su inoculación, disueltos en -- 200 μ l (0,08 % del volumen del cultivo) de acetona. La adición de los PCBs a sustratos sólidos se llevó a cabo por -- evaporación de soluciones en hexano, a las concentraciones adecuadas, sobre la superficie del medio gelificado. Es --- importante la estricta igualación de los volúmenes de disolvente, a fin de poder prescindir de sus efectos sobre el desarrollo del microorganismo, y por ello análogos tratamien-

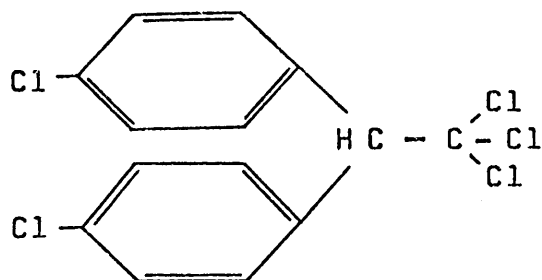
tos, con los disolventes puros, se realizan sobre los controles.

En el primer caso - medio líquido - se opera a las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 ppm de Aroclor; en el segundo - medio sólido - con 1,6; 4; 8 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

La adición de aldrín (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo-5,8-exo-dimetano-naftaleno : I) y DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-cloro-fenil)-etano : II) - asimismo escasamente hidrosolubles - a los cultivos, en los ensayos destinados a la investigación de fenómenos cometabólicos, se llevó a cabo en similares condiciones a las descritas para el caso de los PCBs. Las concentraciones de trabajo fueron de 5 ppm (aldrín) y 7 ppm (DDT).



(I)



(II)

Igualmente en relación con el estudio de fenómenos cometabólicos, se llevaron a cabo, además de una serie de en-

sayos enzimáticos "in vitro" de Aspergillus flavus en presencia de anilina y pentobarbital. Los correspondientes métodos analíticos se describirán en el apartado relativo a ensayos enzimáticos.

2 - EXTRACCION DE LOS COMPUESTOS ORGANOCLORADOS - PCBs, DDT Y ALDRIN -.

Al final de los periodos de incubación, el micelio de A. flavus se separa del medio de cultivo por filtración, recogiendose las células, en el caso de los cultivos de S. cerevissiae, por centrifugación (1000 g / 30 min).

Los medios de cultivo se extraen por tres veces consecutivas con volúmenes iguales de hexano, éter etílico y hexano respectivamente. Reunidos los extractos, se secan durante 30 segundos sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentran hasta un volumen conveniente en un evaporador Kuderna-Danish.

La biomasa se deseca sobre P_2O_5 a presión ligeramente reducida - condiciones en las que se determina su peso seco - y seguidamente se rehumecece - se ha comprobado que la rehumectación favorece la extracción - y homogeneiza en mortero, empleando como abrasivo arena de cuarzo lavada a los ácidos y a las bases y añadiendo Na_2SO_4 anhidro como desecante, de forma que al final de la operación se obtenga un polvo fino y seco.

Los homogeneizados así obtenidos se someten a distinta técnica de extracción, según los compuestos implicados. Habiéndose comprobado que los bifenilos de bajo grado de cloración presentes en las mezclas A-1232, A-1242 y A-1248 no se recuperan debidamente si se someten al proceso de cale-

facción que comporta la utilización de un extractor Soxhlet, los homogeneizados correspondientes se depositan en una columna de vidrio de 1 cm de diámetro con fondo de placa filtrante y se eluye el sistema con 200 ml de hexano, volumen que se ha constatado resulta suficiente para extraer completamente los homogeneizados procedentes de los cultivos de mayor contenido en PCBs.

Las mezclas de A-1254 y A-1260, por el contrario, al igual que el DDT y el aldrín juntamente con sus metabolitos, se extraen en un aparato Soxhlet con acetona: hexano (60:40) durante 4 horas.

Cuando los ensayos se efectúan sobre medios sólidos la totalidad del gel contenido en cada placa se somete a idénticos tratamientos de homogeneización y extracción que los aplicados a las células y micelios desecados.

En todos los casos, los extractos se desecan y concentran según se ha descrito para los obtenidos a partir de los medios de cultivo.

2.1 - PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS.

Para la determinación, cualitativa y cuantitativa, por cromatografía gas-líquido (CGL) de compuestos organoclorados en extractos procedentes de muestras biológicas, se hace necesaria la previa eliminación en dichos extractos de una serie de sustancias, generalmente de naturaleza lipídica o terpenoide, que interfieren en las respuestas cromatográficas. Con el fin de conseguir el adecuado grado de pureza, se han desarrollado una serie de metodologías más o menos equivalentes, una de las cuales es la representada por la secuencia de operaciones citada en Baluja et al. (1973).

Cuando el contenido de las muestras en materiales lipídicos es elevado, el primer paso del proceso de purificación suele consistir en la aplicación de técnicas de reparto entre disolventes inmiscibles, como las descritas por De Faubert Maunder et al. (1964) entre hexano y dimetilformamida, por Onley y Mills (1962) entre hexano y acetonitrilo.

En otras ocasiones — y éste es el caso de la mayoría de las muestras tratadas en este trabajo — la escasa proporción de impurezas presentes en los extractos permite prescindir de los métodos de reparto, a menudo más inseguros -- desde un punto de vista cuantitativo, para utilizar exclusivamente los basados en la cromatografía de adsorción sobre un soporte activo y que a continuación describimos.

Una columna de 1,5 cm de diámetro interno se rellena - hasta una altura de 12 cm con Florisil (silicato de magnesio sintético) de 60-100 mallas, previamente activado por calentamiento a 650 °C durante dos horas, cuidando que el empaquetamiento resulte apretado y homogéneo. Sobre el Florisil se deposita una capa de 2 cm de espesor de Na_2SO_4 anhidro, para asegurar que las soluciones pasen desecadas por el adsorbente activo.

El extracto a purificar se añade cuantitativamente a la columna en un volumen que no debe sobrepasar los 10 ml. El sistema se eluye sucesivamente con 100 ml de hexano y -- 200 ml de hexano-éter etílico (85:15). Recogidos separadamente los correspondientes eluatos y llevados a un volumen conveniente en evaporador Kuderna-Danish, en la fracción de hexano son detectables la totalidad de los PCBs y -- en los ensayos que se llevan a cabo adicionando insecticidas para investigar su metabolismo inducido -- aldrín y DDE (principal metabolito del DDT). En la fracción más polar, que solo se obtiene en los extractos procedentes de cultivos adicionados con insecticidas, eluyen dieldrín (metabolito epoxidado del aldrín) y TDE (metabolito del DDT) caso de que se -- forme.

Los índices de recuperabilidad obtenidos a lo largo -- del proceso, incluidas todas las operaciones, resultan en -- todos los casos lo suficientemente elevados: entre un 95-98% para los PCBs y el grupo del DDT, y entre un 88-90% para el aldrín y el dieldrín.

2.2 - DETERMINACION DE COMPUESTOS ORGANOCLORADOS POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

Concluidas las operaciones de purificación, los extractos se encuentran en condiciones de ser examinados por CGL.

Dicho examen se llevó a cabo en un aparato Perkin-Elmer, modelo F-11, con detector de captura electrónica provisto de electrodo concéntrico y fuente de radiación de --- Ni^{63} . Operando en condiciones óptimas de temperatura, voltaje y caudal de gas portador (N_2), permite la detección y cuantificación sin error significativo de cantidades de --- muestra del orden de 10^{-12} g.

Pese a que, en los medios de cultivo, las concentraciones iniciales de los compuestos objeto de ensayo son de orden micromolar, la elevada sensibilidad del método permite partir de muestras lo suficientemente reducidas como para -- que el material procedente de una sola incubación pueda dividirse en varias alícuotas.

Se utilizaron columnas de vidrio Pyrex, espirales, de 2 m de longitud y 30 mm de diámetro interno. Para su rellenado, las cantidades adecuadas de la fase estacionaria se -- disuelven en cloroformo o diclorometano, se suspende luego en dicha solución el soporte sólido y a continuación se elimina el disolvente por rotación con calentamiento y a vacío. Es importante, en beneficio de la reproductibilidad de los

resultados, que la preparación del relleno, en las columnas mixtas, se lleva a cabo añadiendo el soporte sólido a una solución que contenga ya ambas fases en las proporciones precisas, procedimiento que da mejores resultados que el mezclado de las fases soportadas aisladamente.

Rellena la columna por aplicación de vacío a uno de sus extremos, y taponados ambos con lana de cuarzo, se somete a un proceso de acondicionamiento manteniéndola durante 3 ó 4 días a una temperatura que exceda en 20 - 30 °C la usual de trabajo. A lo largo de este periodo, la columna queda conectada al bloque de inyección del aparato, con objeto de mantener una corriente de gas portador a su través, pero se deja libre el extremo opuesto, que sólo se conecta al detector una vez finalizado el acondicionamiento (el detector, por su parte, debe permanecer todo este tiempo a una temperatura no superior a la que le proporcione el sistema calefactor del horno).

La composición de las fases estacionarias empleadas, así como los parámetros operatorios, se dan en la tabla IV.

La columna designada como I en dicha tabla, rellena con baja carga de una fase de escasa polaridad — una metilsilicona — permite, cuando se trabaja con soluciones que contienen PCBs exclusivamente, la obtención de cromatogramas con un adecuado grado de resolución en periodos de tiempo relativamente breves. Presenta, por otra parte, la ventaja de que, caso de formarse metabolitos de polaridad media a partir de los PCBs, por la acción de los microorganismos, cabría la posibilidad de su detección.

Tabla IV - Fases estacionarias y parámetros operativos utilizados en los análisis por CGL.

Fase estacionar. (% sobre soporte)	Soporte	Temperaturas			Caudal (N ₂)
		C	D	I	
E-301 (1,2%) (I)	Chromosorb W-HP 80-100 mallas	160	180	200	40 ml / min
DC-200 (5%) QF-1 (7,5%) (II)	Chromosorb W-HP 80-100 mallas	200	210	220	60 ml / min

La columna II, por el contrario, no permitiría esta última posibilidad. Con una carga muy superior, y conteniendo una apreciable proporción de la fluorsilicona QF-1 (fase de alta polaridad) es de esperar que incluso productos de polaridad moderada, como posibles derivados de la actividad microbiana sobre los PCBs, quedasen retenidos en la fase estacionaria, o eluyesen con tiempos de retención tan exageradamente elevados que imposibilitarían su detección. La columna de fase mixta (II), sin embargo, resulta de una eficiencia muy superior a la I y se hace imprescindible para la resolución de extractos que contengan una mezcla de PCBs, DDT, aldrín y los metabolitos de ambos insecticidas.

Ninguno de los productos implicados en los análisis -- cromatográficos ofrece problemas de termolabilidad a las -- temperaturas de trabajo utilizadas.

2.3 - EVALUACION DE LAS MEZCLAS DE BIFENILOS POLICLORADOS.

En todos los casos, las determinaciones cuantitativas se llevan a cabo comparando, en los cromatogramas correspondientes a las muestras a valorar y a soluciones estandar de concentración conocida, las áreas de señales con idénticos tiempos de retención. A fin de evitar posibles errores debidos a la falta de linealidad en la respuesta del aparato, - dicha comparación se lleva siempre a cabo entre señales de magnitudes sensiblemente iguales.

El grado de conservación de la composición de una mezcla de PCBs - un Aroclor - después de cada ensayo microbiológico, se evalúa a través del criterio de la variación del perfil cromatográfico. Tal variación se estima cuantitativamente determinando, en los cromatogramas de las soluciones estandar, las relaciones entre las superficies de todas las señales frente a una prefijada y comparándolas con las relaciones homólogas calculadas sobre un cromatograma problema obtenido en idénticas condiciones. Dentro de dos cromatogramas correspondientes a diferentes inyecciones de la misma solución estandar, los cocientes de las relaciones homólogas se mantienen sensiblemente constantes alrededor de la unidad ($\pm 0,03$) cuando la magnitud de las señales se mantiene entre el 40 y el 60 % de la deflexión total de la escala de registro (fig. 9).

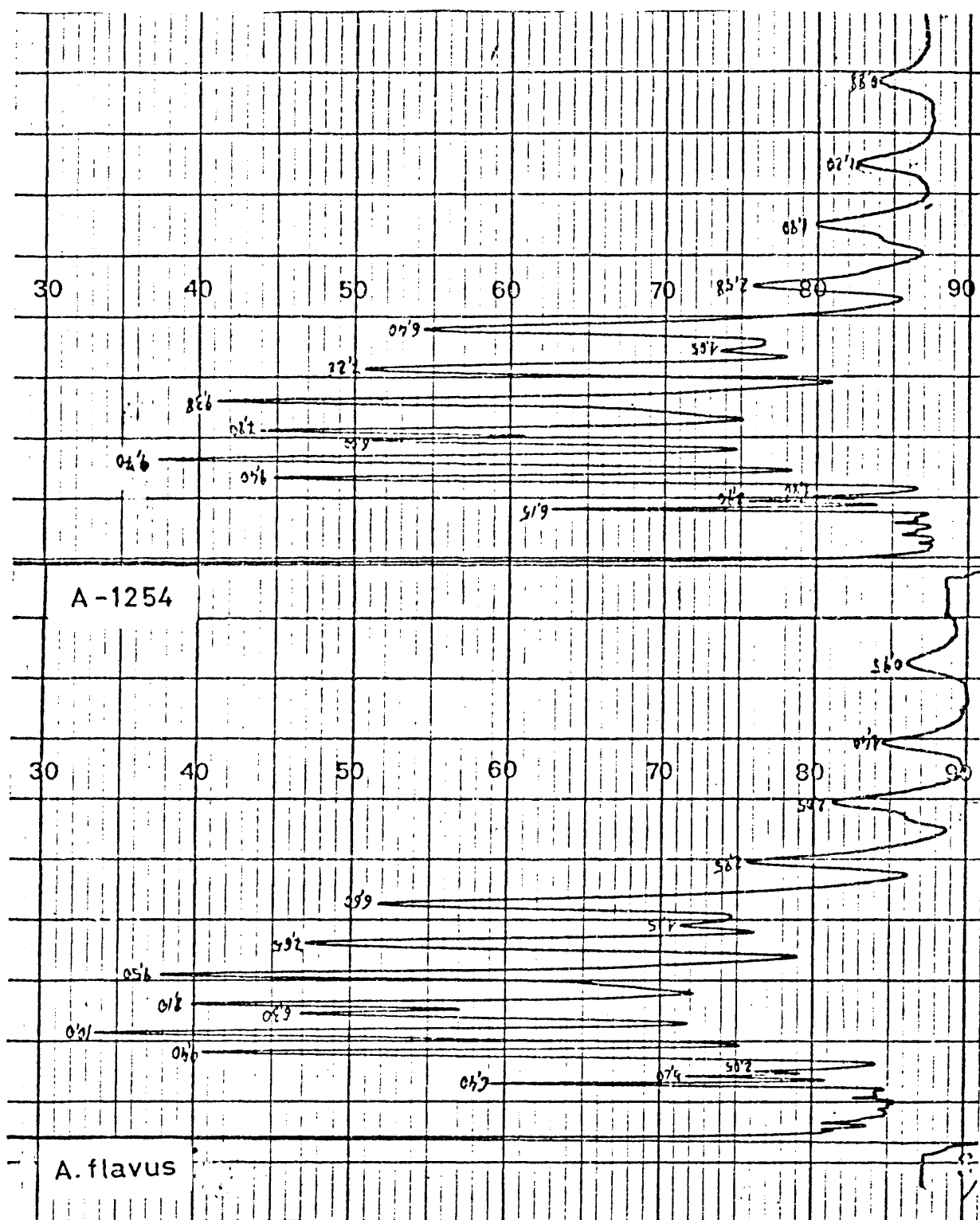


Fig. 9 - Relaciones entre señales de un Aroclor estandar y un extracto de micelio de Aspergillus flavus.

Constatada la conservación del perfil cromatográfico, para la cuantificación se considera como superficie significativa la correspondiente a la suma de los 5 picos más -- "relevantes" del cromatograma.

3 - FRACCIONAMIENTO Y DETERMINACION DE COMPONENTES CELULARES.

Para todos aquellos ensayos que, requiriendo una referencia exacta a la biomasa de procedencia, no exigen la conservación de la actividad enzimática, se parte del micelio desecado sobre P_2O_5 a presión ligeramente reducida y en cámara frigorífica a 0 - 4 ° C.

De las numerosas secuencias de extracción que se describen en la bibliografía, las que comienzan por la separación de los materiales lipídicos (por ejemplo Ogur y Rosen, 1950; Harris, 1967) ofrecen, en el caso particular de este trabajo, la ventaja de que una alícuota del extracto lipídico puede utilizarse en la determinación de los xenobióticos contenidos en el material biológico. Después de varios ensayos, satisfactorios en cuanto a lo que se refiere a la --cuantificación de los PCBs extraídos con la fracción lipídica, tales secuencias metodológicas fueron, no obstante, rechazadas por proporcionar valores anormalmente bajos de ---otros componentes.

Asimismo se evitaron los procedimientos más o menos --fundamentados en el clásico de Schneider (1945; 1957) y que utilizan ácido tricloroacético para la extracción de los --ácidos nucleicos. Las cuantificaciones de estos componentes resultaban de este modo menos reproducibles que en el caso de utilizar ácido perclórico y, pese a que hay autores ----

(Potter et al. 1951; Schneider, 1957) que señalan la interferencia en la reacción de la difenilamina (vease más adelante) de ciertos componentes que coextraen con los ácidos nucleicos trabajando con ácido perclórico sobre células hepáticas, en el caso de las células fúngicas fue este último método el que, después de diversos ensayos, rindió resultados más consistentes.

Así pues, y siguiendo con ligeras modificaciones la secuencia metodológica de Snibko et al. (1967), se homogeneízan 50 - 100 mg del material de partida en mortero, con un peso doble de arena fina de cuarzo lavada a los ácidos y a las bases y un volumen suficiente - 2 a 3 ml - de agua destilada. El homogenato se transfiere a un tubo de centrífuga y el mortero se lava varias veces con agua destilada, lavados que se suman al homogenato hasta completar un volumen de 8 ml. Se enfría el conjunto a 0 ° C y se añaden 0,8 ml de ácido perclórico 70 %. Se agita intermitentemente la mezcla con una varilla de vidrio durante 15 minutos y se centrifuga, extrayéndose a continuación el sedimento otras dos veces consecutivas - siempre a 0 ° C - con ácido perclórico al 5 %.

Tomando los sobrenadantes reunidos como fracción "ácido-soluble", se practica sobre el sedimento una hidrólisis alcalina - NaOH - N / 10 horas / 37 ° C - del RNA. La reacidificación precipita proteínas y DNA, dejando en solución los productos de la hidrólisis del RNA, que se extraen con ácido perclórico al 5 %, en frío. El sedimento obtenido después de dos extracciones, cuyos sobrenadantes reunidos se utilizan para la valoración del RNA, se somete a hidrólisis

ácida — de nuevo con ácido perclórico (1,5%) — a 90 ° C durante 20 minutos, tratamiento que degrada el DNA dejando en solución las desoxipentosas. Extraídas éstas tras dos nuevas centrifugaciones, cuyos sobrenadantes se emplean en la valoración del DNA, el sedimento se trata sucesivamente con: a) ácido perclórico al 0,35% en etanol, b) etanol-cloroformo (3:1), c) dos veces consecutivas con etanol-éter etílico a ebullición suave. Reunidos los sobrenadantes y llevados a un volumen conveniente con éter de petróleo, se someten a un lavado acuoso, se filtran y se recogen en un recipiente tarado. Eliminado el disolvente por evaporación, el peso del residuo representa una evaluación de la cantidad — de lípidos totales (la fig.10 recoge una esquematización de la anterior secuencia extractiva).

En el procedimiento original de Shibko et al. (1967), el sedimento que queda tras la extracción de los componentes lipídicos se utiliza todavía en la determinación de las proteínas, determinación que se reduce a una mera gravimetría después de un periodo de 2 horas de calefacción a 105 ° C. Ni los micelios fúngicos ni las levaduras, son, sin embargo — al contrario que las células hepáticas, a las cuales está referido aquel procedimiento — adecuadamente homogeneizables con procedimientos relativamente suaves, como el aparato de Potter-Elvehjem. La necesaria adición de abrasivos, por tanto, y aun llevando un riguroso control del peso añadido, introduce errores, que pueden llegar a ser considerables, en la determinación de las proteínas por gravimetría del sedimento final seco, lo cual obliga a valorarlas sobre una alícuota del material de partida. De este modo se obvia también el peligro representado por las posibles pérdidas —

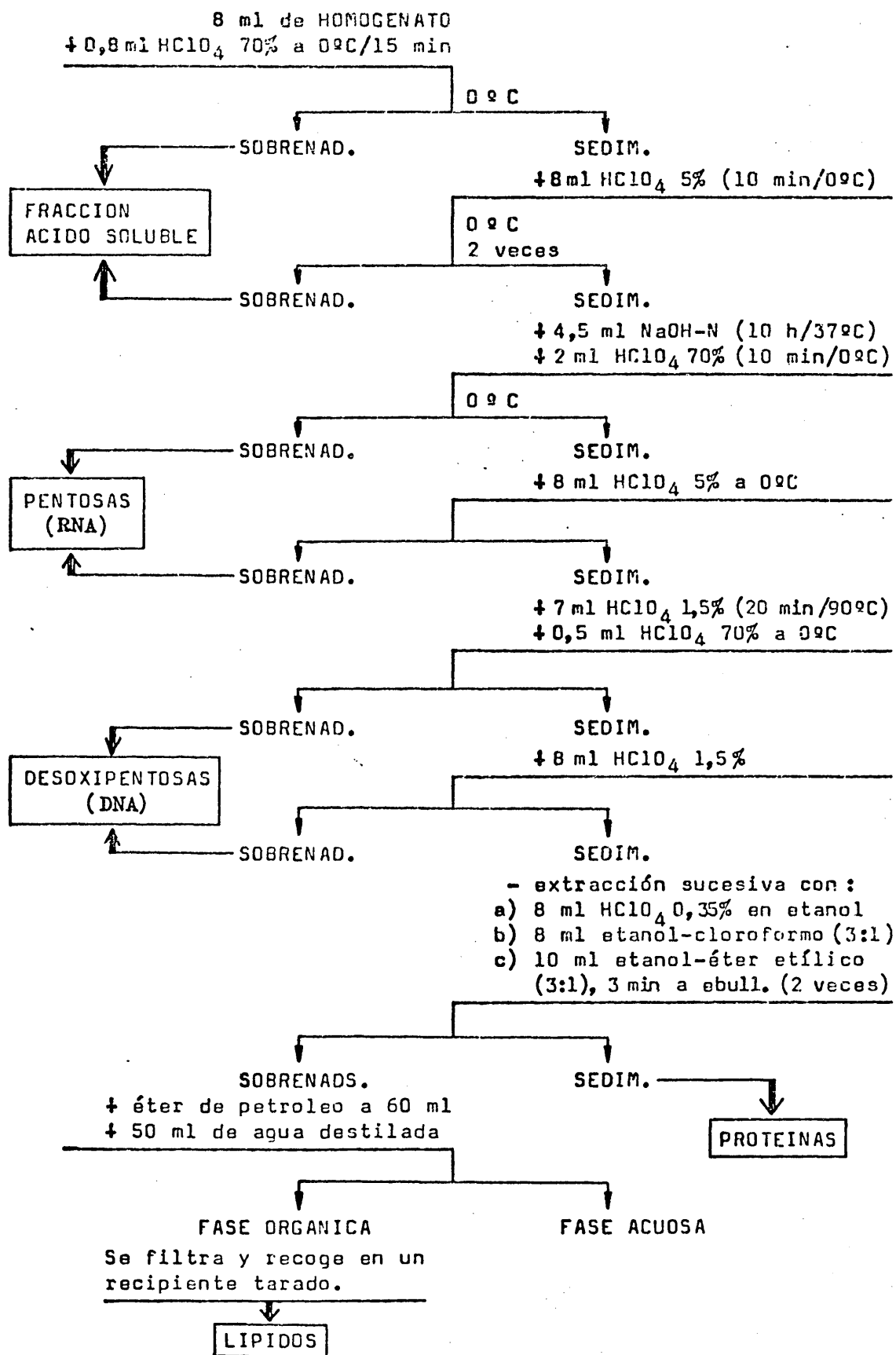


Fig. 10 - Secuencia extractiva utilizada para el fraccionamiento de componentes celulares. Según Shibko et al. (1967), con ligeras modificaciones.

por solubilización irreversible durante la hidrólisis alcalina del RNA.

Asimismo, el extracto lipídico resulta inútil para una cuantificación correcta de los xenobióticos acumulados por el microorganismo a lo largo del periodo de incubación. Pese a la escasísima hidrosolubilidad de los PCBs, y aunque - su elevada estabilidad química les permite resistir todos - los tratamientos descritos, los valores determinados sobre aquel extracto vienen afectados de unos índices de recuperabilidad tan bajos, que es preciso llevar a cabo su determinación a partir de otra alícuota del material biológico desecado.

Los extractos de RNA y DNA se conservan en refrigerador a 0 - 4 ° C hasta el momento de su valoración, que en ningún caso se pospone por un periodo superior a una semana.

3.1 - VALORACION DEL DNA (REACCION DE DISCHE O DE LA DIFENILAMINA).

Entre la abundante metodología disponible para la valoración del DNA -- a través de la cuantificación de su contenido bien en fosfato, bien en bases nitrogenadas o bien en desoxirribosa --, la determinación de este último componente por medio de modificaciones más o menos sustanciales de la clásica reacción de Dische (1930), con difenilamina en una mezcla de ácido acético y ácido sulfúrico a 100 °C, constituye uno de los procedimientos más ampliamente utilizados y al que se ha dedicado una mayor atención.

Burton (1956) mejoró la sensibilidad y la especificidad de dicho método sustituyendo la calefacción a 100 °C / 100 minutos del original, por una "incubación" a 30 °C / 16 - 20 horas, y exaltando el desarrollo de la coloración -- máximo de absorbancia a 600 nm -- mediante la adición de acetaldehído -- al reactivo, adición que mejora asimismo la proporcionalidad de la respuesta espectrofotométrica y que no surte efecto -- con calefacciones más drásticas. El método de Burton, pues, consiste en :

REACTIVO

Difenilamina	1,5 g
Acido acético	100 ml
Acido sulfúrico conc. ...	1,5 "

La mezcla debe guardarse en frasco tapado y lugar oscuro, y resulta inutilizable si desarrolla coloración azulada (frecuentemente debida a una calidad inadecuada del ácido acético). Inmediatamente antes de la valoración se le añade un 0,5% (v/v) de una solución acuosa al 1,6% (p/v) de acetaldehído. Un volumen (1-2 ml) de la solución a valorar se mezcla con dos volúmenes del reactivo así preparado y, -- después de la incubación en las condiciones indicadas, se mide su absorbancia a 600 nm frente a un patrón adecuado (una solución de DNA sometida a idéntico tratamiento, o una solución de desoxirribosa).

Posteriormente, Giles y Myers (1965) introdujeron otra modificación que, especialmente en tejidos vegetales, significa un perfeccionamiento del método de Burton: elevaron la cantidad de difenilamina en el anterior reactivo a 4 g -- suprimiendo el ácido sulfúrico si la solución a valorar contiene ya ácido perclórico al 10% --, añadiendo el acetaldehído no al reactivo, sino a la mezcla de incubación, en la cual, por otra parte, solución a valorar y reactivo contribuyen -- con volúmenes iguales. Así, a 2 ml de la solución a valorar se le añaden 2 ml de reactivo y 0,1 ml de una solución acuosa al 0,16% (p/v) de acetaldehído (que viene a representar un 0,004% p/v en la mezcla, frente al 0,005% p/v del caso anterior). Desarrollado el color en las mismas condiciones que las especificadas por Burton, la absorbancia se mide ahora a 595 nm, corrigiendo el valor obtenido por sustracción del hallado a 700 nm, con objeto de minimizar el error debido a la turbidez, muy frecuente en extractos vegetales.

En este trabajo se han tenido en cuenta todos los aspec

tos de la anterior evolución metodológica, pero habiéndose constatado que la aplicación del método de Giles y Myers — más sensible que el de Burton — conducía a menudo a valores excesivos de la corrección por turbidez, y ensayadas diferentes proporciones entre los componentes del reactivo antes anotado, se encontró que los resultados más satisfactorios correspondían a una solución de 3 g de difenilamina y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado en 100 ml de ácido acético. En el resto del proceso se operó según las especificaciones de Giles y Myers, salvo en lo que concierne a la proporción de acetaldehído (a la mezcla de incubación se añade 0,1 ml de una solución acuosa al 0,2% de éste).

Las concentraciones de desoxirribosa en los extractos — se obtienen por interpolación de las absorbancias leídas en una recta de calibrado determinada por ajuste — según el método de los mínimos cuadrados — de las lecturas correspondientes a una serie de diluciones de una solución standard — de desoxirribosa.

Las soluciones acuosas de desoxirribosa, al menos a concentraciones que no excedan de 1 mM, se conservan estables, refrigeradas a 0-4 °C, durante al menos 3-5 meses, pudiendo ser utilizadas como estandar dentro de este periodo. Antes de su empleo es preciso acidificarlas con ácido perclórico hasta un pH equivalente al de los extractos de DNA a determinar; de otro modo las intensidades de color en standards y problemas no resultan homologables. Es conveniente, asimismo, preparar el reactivo de difenilamina inmediatamente antes de su utilización.

3.2 - VALORACION DEL RNA (REACCION DE MEJBAUM, O DEL ORCINOL).

En situación análoga a la del caso anterior, de los diversos procedimientos disponibles para la valoración del RNA, se optó por la determinación de ribosa.

Basado en la también clásica reacción de Mejbaum (1939), el método descrito por Schneider (1957), y al que en la actualidad sigue recurriéndose ampliamente, consiste en:

REACTIVO

Orcinol	1,0 g
FeCl ₃	0,5 "
ClH concentrado ...	100 ml

El reactivo debe prepararse por adición del orcinol a la solución de cloruro férrico en clorhídrico inmediatamente antes de comenzar el proceso de valoración. Este se lleva a cabo añadiendo un volumen - 1,5 a 2 ml - de reactivo a un volumen igual de la solución a valorar y sometiendo el conjunto a calefacción en baño de agua a ebullición durante 20 minutos. La intensidad del color verde desarrollado se mide seguidamente a 660 nm.

En este trabajo se utiliza un reactivo en el que la concentración de Cl₃Fe se rebaja hasta un 0,033% (p/v), lo cual, según señalan Ogur y Rosen (1950), contribuye a redu-

cir la respuesta de los blancos al mismo tiempo que eleva la sensibilidad del método.

Las concentraciones de las soluciones a valorar se miden frente a soluciones patrón de ribosa conservadas y tratadas en modo similar a como quedó descrito para las de desoxiribosa, llevándose a cabo el cálculo, asimismo, por análogo procedimiento.

3.3 - EXTRACCION Y VALORACION DE PROTEINAS.

Una alícuota - 20 a 40 mg - de material biológico desecado se homogeneiza en mortero con arena fina de cuarzo y un volumen conveniente - 1 a 2 ml - de NaOH - 1N. Recogido el homogenato en un tubo de centrifuga al que se añaden los lavados del mortero (también con NaOH - 1N) hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 8 ml, se mantiene el conjunto en baño de agua a ebullición, durante 10 minutos, agitando intermitentemente con una varilla de vidrio. Después de centrifugar, el sedimento se reextrae a temperatura ambiente del mismo modo. Los sobrenadantes reunidos se utilizan en la determinación de proteínas.

Esta se lleva a cabo siguiendo el procedimiento del microbiuret descrito por Goa (1953) y que, proporcionando unos valores coherentes con los obtenidos por el método de Kjeldahl, resulta, entre las técnicas usuales, la de aplicación más sencilla.

Para ello, se mezclan en el orden y proporciones volumétricas indicadas:

1 - extracto proteico a valorar	...	0,5 ml
2 - NaOH - 1N	2,0 "
3 - Reactivo de Benedict	0,2 "

Consistiendo el reactivo de Benedict:

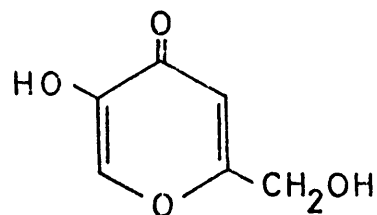
Citrato sódico cristalino ...	17,30 g
Na ₂ CO ₃ anhidro	10,00 "
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,73 "
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

Después de un intervalo de alrededor de 20 minutos a -- temperatura ambiente, durante el cual se desarrolla y estabiliza el color, se mide la absorbancia a 330 nm frente a un -- blanco en el que la solución proteica se sustituye por un volumen equivalente de NaOH - 1N.

El cálculo de las concentraciones de proteína se lleva a cabo, de modo análogo al empleado en los casos de la ribosa y desoxirribosa, por interpolación en una recta de calibrado obtenida con un standard de albúmina bovina. En las soluciones de albúmina para el calibrado no conviene exceder -- la concentración de 5 mg/ml (alrededor de 1 mg/ml en las -- cubetas de medida). Un intervalo aconsejable para tales soluciones es el comprendido entre 0,1 y 3,0 mg/ml.

3.4 - VALORACION DE ACIDO KOJICO.

A partir de la revisión de Foster (1949) el método más generalizado para la valoración del ácido kójico (2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona: I) se basa en la formación de un complejo férrico en medio de ácido --clorhídrico diluído, con ulterior medida a 540 nm de la coloración --desarrollada.



(I)

La elevada hidrosolubilidad del ácido kójico (3,95 g/ 100 ml) determina que la mayor parte del sintetizado por el microorganismo se libere al medio de cultivo, donde puede --valorarse directamente, sin necesidad de proceso extractivo previo. En ocasiones es necesaria, en cambio, la previa des--proteinización del medio de cultivo, que puede llevarse a --cabo por precipitación de las proteínas con ácido tricloro--acético en concentraciones de hasta el 1% en la solución --final.

Siguiendo la modificación de Bentley (1957) al método de Arnstein y Bentley (1953), para la valoración se añaden 4 ml de una solución al 1% de FeCl_3 en HCl 0,1 n a una alí--cuota del medio objeto de ensayo. Diluído el conjunto a 10 ml con medio de cultivo fresco, se mide a continuación la --absorbancia a 540 nm frente a un blanco obtenido por adi--ción de medio fresco y reactivo en proporciones equivalen--

tes a las de los ensayos. Para el cálculo de las concentraciones se utiliza una recta de calibrado determinada de modo análogo a como se describió en anteriores apartados.

Conviene advertir que en los casos en que se hace necesaria la utilización del ácido tricloroacético, la reacción pierde sensibilidad, inconveniente que puede obviarse elevando ligeramente -- hasta un 2% -- la concentración del FeCl_3 en el reactivo.

La determinación del ácido kójico que permanece en el micelio se puede llevar a cabo sobre este material desecado y homogeneizado en la forma usual. Después de una extracción previa con éter de petróleo (Lahoz et al., 1966) a fin de eliminar interferencias lipídicas, se reextrae en Soxhlet con éter etílico.

Eliminado el disolvente en rotavapor, se trata el residuo sólido con H_2O destilada en baño de agua a $60 \pm 2^\circ \text{C}$ durante unos minutos. Se filtra a través de papel Watman y, a continuación, se pasan sobre éste dos lavados más del recipiente en el que se llevó a cabo la evaporación con agua destilada templada. Una vez llevada la solución filtrada a un volumen conveniente, se procede a la valoración del ácido kójico en la forma ya indicada.

4 - ENSAYO DE ALGUNAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS CARACTERISTICAS DE LA FRACCION MICROSOMICA.

4.1 - PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO.

Siendo el objeto de estos ensayos la comparación entre los niveles de ciertas actividades enzimáticas - relacionadas, en otras entidades biológicas, con el metabolismo de xenobióticos, y localizadas en la fracción microsómica - en microorganismos desarrollados en condiciones "control", --- frente a los incubados en presencia de distintos Aroclor, - el material biológico de partida consiste en las cosechas - que, al cabo de idénticos periodos de incubación, se obtiene de tales cultivos. La concentración de Aroclor utilizada es, en todos los casos, de 25 ppm.

Separados medio y micelio y lavado este último varias veces con tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,4, sobre un embudo Büchner, se procede seguidamente a su homogeneización.

4.1.1 - HOMOGENEIZACION.

Intentada esta mediante el dispositivo de Potter-Elvehjem, se comprobó que el método resultaba absolutamente inadecuado para el *A. flavus*. Si bien los aglomerados de micelio se disgregan con facilidad, las hifas aisladas presentan un grado muy escaso de rotura aún después de perio-

dos de tratamiento prolongados (después de un cierto tiempo, la prolongación del tratamiento no aumenta significativamente el grado de rotura).

Mejores resultados, pero todavía insatisfactorios, proporciona la prensa de French, dispositivo mediante el cual una muestra de material celular — sobreenfriada a -25°C — se hace pasar a través de un orificio de reducidas dimensiones, aplicando, con una prensa "ad hoc", una presión elevada. Aunque el grado de rotura así conseguido es muy superior al que se obtiene con el Potter, se estabiliza también, después de 4 a 5 repeticiones del proceso, en una proporciones insuficientes.

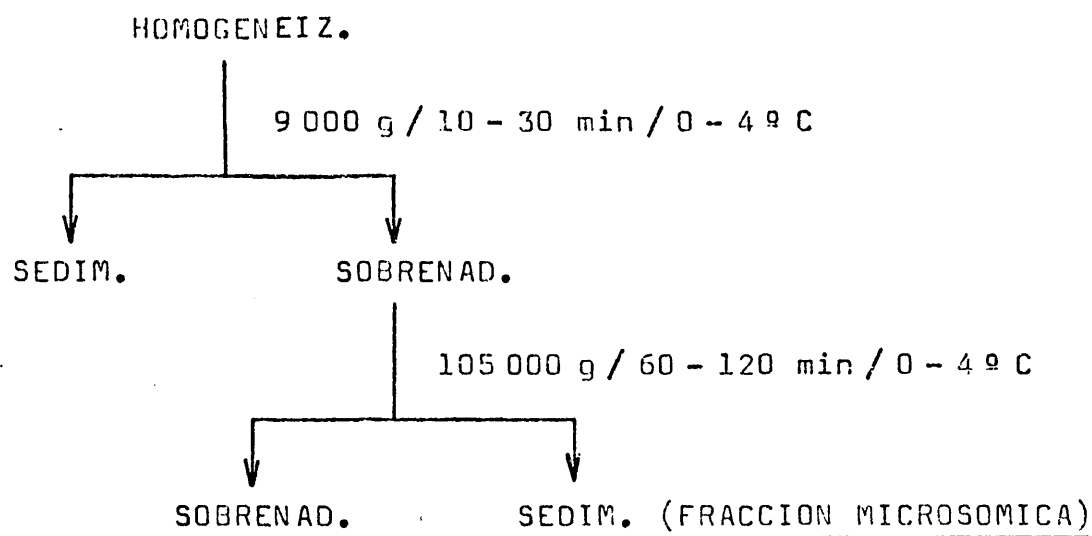
La homogeneización de la muestra sobreenfriada a -25°C con arena fina de cuarzo, en mortero de porcelana no esmaltada, se reveló como la técnica más aceptable. Durante el tratamiento, el mortero se mantiene en un baño de hielo — NaCl — etanol. Para que el proceso proporcione un rendimiento más o menos satisfactorio, que debe seguirse por observación microscópica, el homogeneizado obtenido después de unos 15—20 min de manipulación se suspende en un volumen conveniente del tampón antes indicado y se centrifuga 15 minutos a baja velocidad. Recogido el sobrenadante, se repite con el sedimento el proceso sobreenfriamiento / homogeneización / centrifugación. Cuatro de estas repeticiones son suficientes, por lo general, para alcanzar un grado adecuado de rotura.

Los sobrenadantes reunidos deben someterse, ulteriormente, a 5—6 sesiones de sonicación — método que aplicado

al micelio intacto mostró una escasísima eficacia -- de 30 segundos cada una. Aunque con ello no se alcanza normalmente un mayor grado de rotura, se consigue extraer de muchos fragmentos hifales el contenido citoplásmico aún adherido a las paredes celulares.

4.1.2 - SEPARACION DE LA FRACCION MICROSOmica.

El procedimiento estandar para la obtención de microsomas a partir de una suspensión de material celular debidamente homogeneizado, puede esquematizarse como sigue:



Conviene señalar no obstante, que en la bibliografía -- abundan las referencias a "fracciones microsómicas" que difícilmente pueden considerarse homologables.

En primer lugar, el material biológico de partida, así como las manipulaciones previas a que se somete, afectan -- tanto al tamaño medio como al rango de tamaños de los fragmentos de retículo endoplásmico que, en rigor, constituyen la fracción microsómica. Por lo que, del mismo modo que es posible la pérdida de fragmentos grandes en el sedimento de 9 000 g, lo es también la contaminación del sedimento de 105 000 g con otros componentes celulares (especialmente mitocondrias de pequeño tamaño). El anterior esquema, amplia y satisfactoriamente aplicado a materiales como el hígado -- de mamíferos, no garantiza, pues, la obtención de fracciones microsómicas puras en otros casos, proceso que exige, -- aún en el anterior tejido, un seguimiento microscópico de -- la secuencia operatoria.

Por otra parte, son frecuentes los autores que utilizan fracciones microsómicas aún menos depuradas, como el so brenadante de 22 000 g / 25 min (Yu et al. 1971, trabajando -- con raíz de judía) e incluso el sobrenadante de 9 000 g / 30 min (Smith y van Loon, 1969 y Litterst et al. 1972, ambos -- grupos trabajando con hígado de rata).

Este último proceder presenta la ventaja, al menos en los estudios que implican a las oxidasas de función mixta, de no separar la fracción microsómica propiamente dicha de una serie de cofactores presentes en la fracción soluble y esenciales para el funcionamiento de las O.F.M. microsómicas. Mitoma et al. (1956), por ejemplo, estudiando el proce so de hidroxilación aromática en hígado de conejo, encuentran que la actividad enzimática que se manifiesta en el so brenadante de 9 000 g / 10 minutos -- microsomas más fracción

soluble —, no es demostrable ni en el sedimento de 100 000 g / 30 minutos — microsomas —, ni en el correspondiente sobrenadante — fracción soluble — ensayados aisladamente. Los ya citados Yu et al. (1971), por otra parte, encuentran que -- tanto la epoxidación como la dihidroxilación del aldrín en raíz de judía, se localizan muy preferentemente en el sobrenadante de 22 000 g / 25 minutos, manifestándose actividades más moderadas — a veces muy bajas — en el correspondiente — sedimento, así como en sobrenadante y sedimento de 105 000 g / 120 minutos.

En el caso del hígado de conejo, la adición de un sistema generador de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (NADP^+ en presencia, por ejemplo, del sistema glucosa - 6 - fosfato + glucosa - 6 - fosfatodeshidrogenasa) al sedimento de 100 000 g, reconstituye un 70 - 80 % de la actividad hidroxilante hallada en el sobrenadante de 9 000 g, lo cual indica que la contribución de la fracción soluble a tal actividad radica, al menos fundamentalmente, en la reducción del NADP^+ . No es ésta, sin embargo, la situación en la raíz de judía, donde todas las fracciones se ensayan suplementadas con un sistema generador de -- $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Cabe, pues, pensar en la intervención de otros cofactores esenciales para el logro de un máximo de actividad.

Por estas razones, y en la total ausencia de bibliografía más o menos indicativa, que trate esta problemática en materiales biológicos de naturaleza fúngica, en el presente trabajo se optó por la utilización de la fracción más íntegra posible. Así, el homogenizado obtenido por el procedimiento

to antes descrito, se centrifuga a 9 000 g / 20 minutos /
/ 0 - 4 ° C . Desechado el sedimento, el sobrenadante se concentra por liofilización hasta un volumen tal que 1 ml de solución represente aproximadamente la fracción correspondiente a 500 mg de micelio fresco. La concentración de proteína en el preparado enzimático así obtenido es de 8 - 10 mg / ml.

Entre el momento de la cosecha y el del ensayo enzimático no se deja transcurrir nunca un periodo de tiempo superior a 10 días.

4.2 - CONDICIONES DE LOS ENSAYOS ENZIMATICOS.

Además de una alícuota del preparado enzimático y una cantidad conveniente del sustrato adecuado, la mezcla de incubación se suplementa con una serie de cofactores esenciales - o simplemente potenciadores - de la actividad de las oxidasas de función mixta.

En la bibliografía al respecto se describen diversos - suplementos de este tipo, que, en el caso más complejo, consisten en una solución tamponada (usualmente con fosfato \sim 0,1 M o Tris \sim 0,05 M, a pH \sim 7,4) que contiene FeCl_3 , nicotinamida, NADP^+ y un sistema capaz de pasar al piridinnu-cleotido a su forma reducida ($\text{NADPH} + \text{H}^+$). El más convencional de estos sistemas es el formado por la glucosa-6-fosfato y la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, aunque también es relativamente frecuente el empleo de DL-isocitrato con DL-isocitratodeshidrogenasa.

Los componentes de tales suplementos pueden variar dentro de márgenes bastante amplios, e incluso se puede prescindir de alguno de ellos. Particularmente cuando se trabaja con el sobrenadante de 9 000 g, la adición de nicotinami-da no parece necesaria, habiendo autores que asimismo estiman que, en tales circunstancias, el preparado enzimático contiene ya deshidrogenasas y sustratos deshidrogenables en cantidad suficiente para que su funcionamiento acoplado con la reducción del NADP^+ que se añade, provea de los niveles

necesarios de NADPH + H⁺.

En este trabajo, sin embargo, se hace uso de una suple-
mentación completa, y así, a 2 ml del preparado enzimático,
se añaden 3 ml de una solución acuosa conteniendo :

Tampón fosfato pH = 7,4	250	μmol
Nicotinamida	50	"
MgCl ₂ · 6H ₂ O	50	"
NADP ⁺	0,6	"
Glucosa - 6 - P	20	"
Glucosa - 6 - P deshidrogenasa ...	0,5	U.E.
SUSTRATO	0,1 - 0,5	μmol (según casos)

El conjunto se mantiene en agitación a 37 ° C durante -
30 minutos en un incubador Dubnoff, tras lo cual se evalúa
el nivel de actividad enzimática a través de la estimación
de la transformación del sustrato por métodos que varían se-
gún éste.

Como sustratos se utilizan, además del insecticida or-
ganoclorado aldrín - cuya epoxidación "in vivo" quedó demo-
strado se exaltaba con la presencia de PCBs -, anilina (3
μmol en la solución antes descrita), pentobarbital (1 μmol)
y metilanilina (5 μmol). Estos tres últimos compuestos ---
constituyen sustratos abundantemente empleados en la inves-
tigación de las hidroxilaciones aromáticas, hidroxilaciones
alifáticas y desmetilaciones, respectivamente, llevadas a -
cabo por las O.F.M. presentes en el retículo endoplásmico -
liso de las células hepáticas de mamíferos.

4.3 - VALORACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Como acaba de mencionarse, las actividades investigadas son las esquematizadas en la fig. 11.

La epoxidación del aldrín se determina cuantificando - las cantidades de aldrín y dieldrín presentes en la mezcla de incubación después del ensayo. Para ello se extrae dicha mezcla tres veces consecutivas con un volumen igual de hexano cada vez y el extracto se estudia combinando las técnicas de cromatografía de adsorción sobre Florisil activado y cromatografía gas-líquido con detección por captura electrónica, según la metodología descrita en el apartado correspondiente.

La hidroxilación (aromática) de la anilina se estima - mediante la valoración del p-aminofenol formado, por el método del fenol-indofenol de Brodie y Axelrod (1948), según la modificación de Sasame y Gillette recogida por Kato y Gillette (1965). Saturada la mezcla de incubación con ClNa, se extrae con un volumen conveniente - ~4 ml - de éter etílico libre de peróxidos. Decantada la fase acuosa, se agita una alícuota del extracto etéreo con 3 ml de un reactivo --

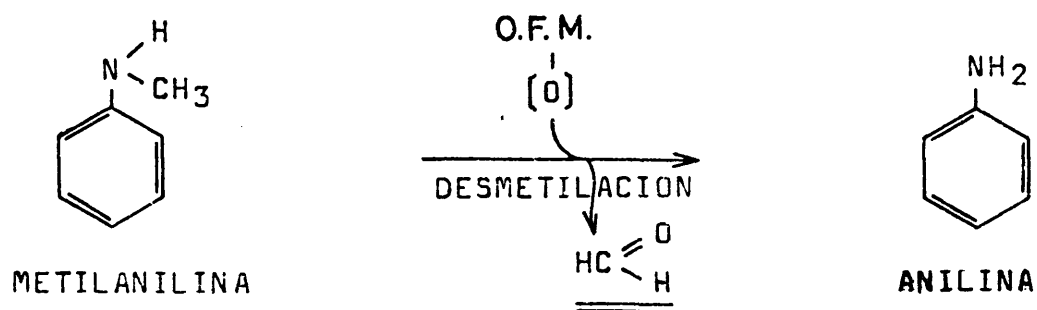
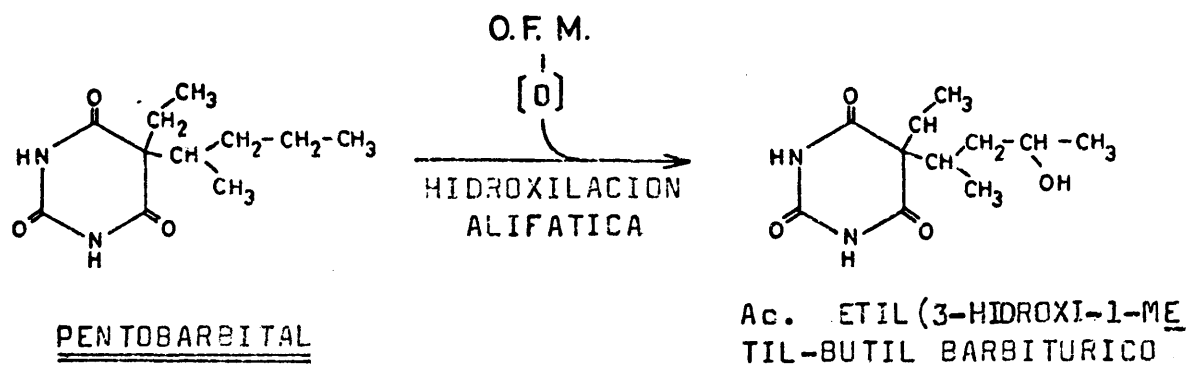
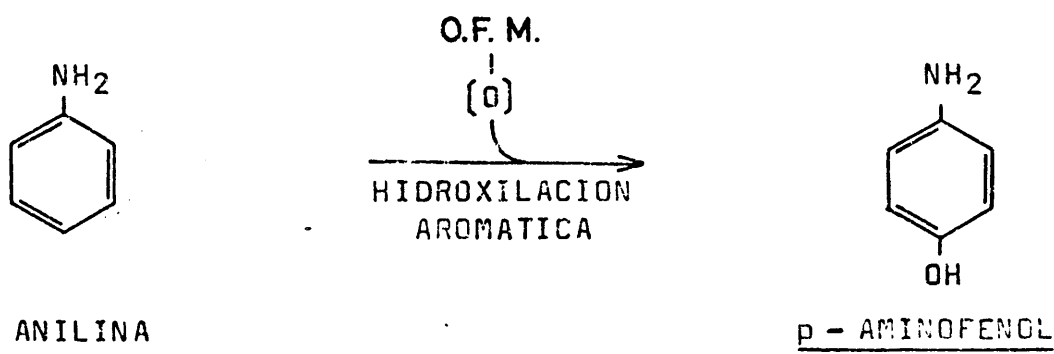
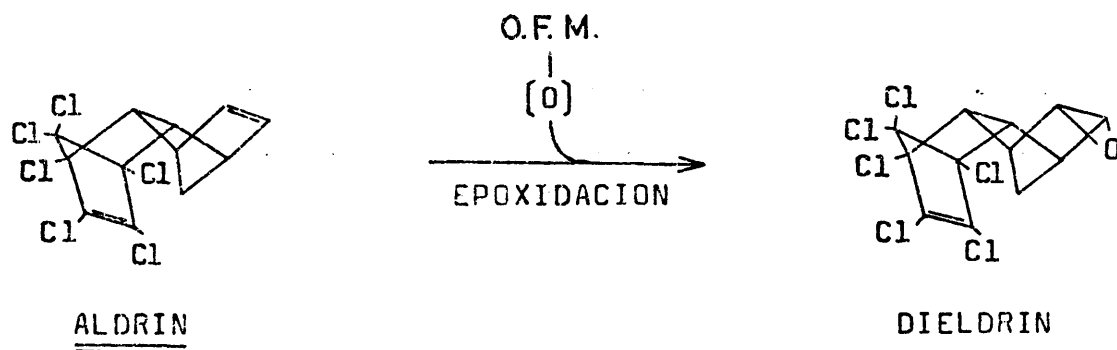


Fig. 11 - Actividades enzimáticas ensayadas con el sobrenadante de 9 000 g. Los compuestos subrayados son aquellos a través de cuya valoración se estima la actividad.

consistente en una solución de fenol al 1% en NaOH 0,1 N. Separadas las fases y eliminada la etérea, se deja reposar la acuosa durante 30 minutos, transcurridos los cuales se mide la absorbancia del color desarrollado a 620 nm. Las concentraciones de p-aminofenol se determinan por interpolación de los valores encontrados en una recta de calibrado obtenida a partir de una serie de diluciones de una solución etérea de p-aminofenol, tratadas con el anterior reactivo.

La hidroxilación (alifática) del pentobarbital (ácido etil (1-metil-butil) barbitúrico) se valora por determinación de las cantidades de sustrato intransformado después de la reacción, según el método de Brodie et al. (1953). Para ello a 2 ml de la mezcla de incubación se añade:

Tampón fosfato pH = 5,5	1 ml
NaCl	1 g
Solución al 1,5% de alcohol	
isoamílico en éter de petróleo ...	30 ml

Se agita la mezcla durante 45 minutos separandose a continuación las fases, por centrifugación si fuese necesario. A 20 ml de la fase etérea se le adicionan ahora 4 ml de una solución tamponada a pH = 11, preparada mezclando:

NaOH 10 N	8,5 ml
Na ₂ PO ₄ H 0,8 M	200 "

De nuevo se agita la mezcla durante 3 minutos y, una

vez separadas las fases, se mide en la etérea la absorban-
cia a 240 nm.

Para el trazado de la recta de calibrado se prepara --
una solución stock de pentobarbital, disolviendo 10 mg de --
este compuesto en 3 ml de NaOH 0,1 N y llevando a volumen --
de 100 ml con agua destilada. Obtenidas a partir de esta so-
lución una serie de diluciones, 1 ml de cada una de ellas --
se trata con 4 ml del tampón formado con NaOH 10 N y PO_4HNa_2
0,8 M y ajustado a pH=11, midiendose a continuación la ab-
sorbancia a 240 nm.

La desmetilación de la metilanilina se cuantifica a --
través de la valoración del formaldehído eliminado en el --
proceso, por el método de Nash (1953) según la modificación
de Cochin y Axelrod (1959). Para ello, a 3 ml de la solu-
ción a valorar se añade:

ZnSO_4 (solución acuosa al 20%)	1 ml
$\text{Ba}(\text{OH})_2$ (solución acuosa saturada) ...	1 "

Centrifugada la mezcla para la obtención de un sobrena-
dante libre de proteínas, a una alícuota de 2,5 ml de dicho
sobrenadante se adiciona ahora 1 ml del reactivo de Nash
"doble fuerza":

Acetato amónico	75 g
Acetilacetona	1 ml
Agua destilada	c.s.p. 250 ml

La mezcla se somete a calefacción durante 30 minutos - en un baño de agua a 60 ° C, midiéndose inmediatamente después la absorbancia de la solución a 415 nm, e interpolando los valores hallados en una recta de calibrado obtenida a partir de una serie de diluciones de una solución acuosa -- estandar de formaldehído, tratadas de modo análogo a como -- se hizo con la solución a valorar.

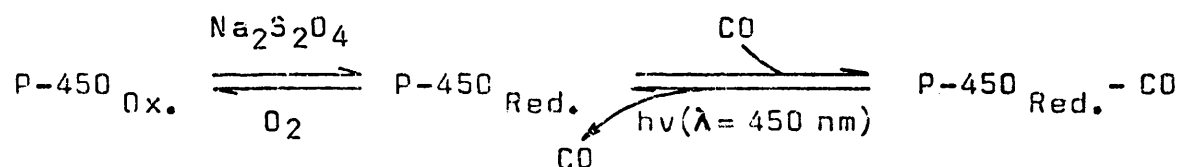
4.4 - INVESTIGACION DE LA PRESENCIA DE CITOCROMO P-450.

El citocromo P-450 -- según se comentó en un apartado -- precedente -- ha sido detectado en muy diversas entidades -- biológicas como la oxidasa final de las cadenas de transporte electrónico vinculadas al metabolismo de xenobióticos. -- Aunque su presencia ha sido también puesta de manifiesto en la fracción mitocondrial de ciertos tejidos animales, como el córtex adrenal, su localización preferente la constituye la fracción microsómica, en la que ha sido valorada en algunos tejidos vegetales, en ciertos órganos de insectos y, sobre todo, en células hepáticas de mamíferos.

En el presente trabajo, la investigación de su presencia se llevó a cabo en sobrenadantes de 9 000 g obtenidos -- por el mismo procedimiento que el utilizado para el ensayo "in vitro" de las actividades enzimáticas más atrás mencionadas.

Siguiendo, como es lo usual, el método de Omura y Sato (1967), a una alícuota de 5 ml de la solución a valorar se adiciona 1 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -- que reducirá al citocromo -- saturando a continuación la muestra con monóxido de carbono, -- por burbujeo de este gas durante unos 30 segundos. Inmediatamente después se registra en continuo el espectro de dicha muestra entre 380 y 500 nm en un aparato de doble haz y colocando como referencia otra alícuota de la solución a valorar, reducida con ditionito pero sin tratar con CO .

Las anteriores operaciones, conducentes a la formación de un complejo citocromo reducido - CO según el esquema adjunto, deben realizarse con cierta rapidez, en condiciones de anaerobiosis (ya que el citocromo es autooxidable en presencia del O_2 , entrando este compuesto a competir con el CO por el citocromo reducido) y en ausencia de luz, que provocaría la descomposición del complejo final.



La identificación del citocromo se efectúa en base al complejo formado en su estado reducido con el monóxido de carbono, complejo que presenta en su espectro una banda a 450 nm, fenómeno al que debe su denominación.

5 - DETERMINACION MICROMANOMETRICA DEL CONSUMO DE OXIGENO POR LOS MICROORGANISMOS ENSAYADOS.

Se lleva a cabo según la técnica de Warburg - Barcroft en microrespirómetros B. Braun (Melsungen. Alemania), adaptables a un termostato con soportes para una serie de manómetros que pueden ser agitados a la velocidad y amplitud de seeadas. Cada respirómetro constituye un sistema hermético - formado por un manómetro y un recipiente de reacción provisto de una rama lateral y un pocillo central.

Para las determinaciones de intercambios gaseosos realizadas en este trabajo, en cada recipiente de reacción se depositan 2,5 ml de una suspensión, en los medios de cultivo adecuados, de esporas (A. flavus) o células vegetativas separadas por centrifugación de un cultivo al comienzo de su fase de crecimiento exponencial (S. cerevisiae).

La concentración de dichas suspensiones se ajusta previamente (por diluciones y recuento en cámara hematocitómetrica) de forma que sea suficiente para que el oxígeno consumido, incluso en las primeras etapas, resulte fácilmente medible. Es preciso, no obstante, tener en cuenta que poblaciones excesivamente densas conducen con frecuencia a resultados anómalos, probablemente a causa de alteraciones en la intensidad normal del intercambio de gases a nivel de superficies de contacto intercelulares.

En cualquier caso, los medios llevan incorporado Tween-20 al 0,01%, a fin de asegurar una dispersión celular homogénea, impidiendo la formación de aglomerados. Idéntica concentración del agente detensor lleva, por supuesto, el recipiente de reacción con medio estéril - termobarómetro - utilizado para la normalización barométrica de la experiencia.

Los PCBs se adicionan a las suspensiones a ensayar en cantidades que proporcionen una concentración de 25 ppm, -- portados en 10 μ l de acetona. Idénticas proporciones de disolvente puro se adicionan a la suspensión control, así como al termobarómetro.

Para captar el CO_2 desprendido y conseguir que su presión parcial en el interior del sistema sea nula, o al menos irrelevante, en la rama lateral de cada recipiente de reacción se depositan 0,1 ml de KOH 4N, absorbidos sobre -- 1 cm^2 de papel de filtro, a fin de elevar la superficie captadora. De este modo, los cambios de presión producidos en el recipiente serán únicamente atribuibles a las variaciones en la presión parcial de oxígeno. El descuento de las variaciones experimentadas en el recipiente termobarométrico permite, finalmente, asignar unos valores a la contribución respiratoria.

Una vez que, colocados los respirómetros en agitación continua y con el vaso sumergido en un baño termostatzado a 30 °C, el conjunto haya alcanzado una temperatura homogénea (conviene aguardar un intervalo de alrededor de 30 minutos), se ajusta el líquido manométrico a una división de-

terminada de la escala, que corresponde al volumen deseado en el recinto de reacción, e inmediatamente después se cierra el sistema.

Las medidas se efectúan siempre a volumen constante, - enrasando la altura del líquido barométrico en la rama cerrada con la división prefijada anteriormente y leyendo la altura alcanzada en la rama abierta.

La relación existente entre la diferencia de presión - reflejada en la escala manométrica y el gas consumido en el mismo periodo de tiempo, es diferente para cada respirómetro, hallándose definida por un parámetro K_{O_2} , que, según Umbreit et al. (1957), está determinado por:

$$\frac{O_2 (\mu l)}{\Delta P (mm)} = K_{O_2} = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_o}$$

Relación en la que intervienen las siguientes magnitudes:

V_g = Volumen en la fase gaseosa. Varía para cada recipiente.

V_f = Volumen de la fase líquida. 2500 μl de medio + 100 μl de KOH 4N.

α = Coeficiente de solubilidad del O_2 en soluciones salinas acuosas. 0,026 a 30 ° C.

t = Temperatura de trabajo (30 ° C).

T = 273 ° + 30 ° = 303 ° K.

P_o = Presión normal, expresada en mm de líquido manométrico.

trica. 10.000 mm Srodio ~~X~~ 760 mm de Hg.

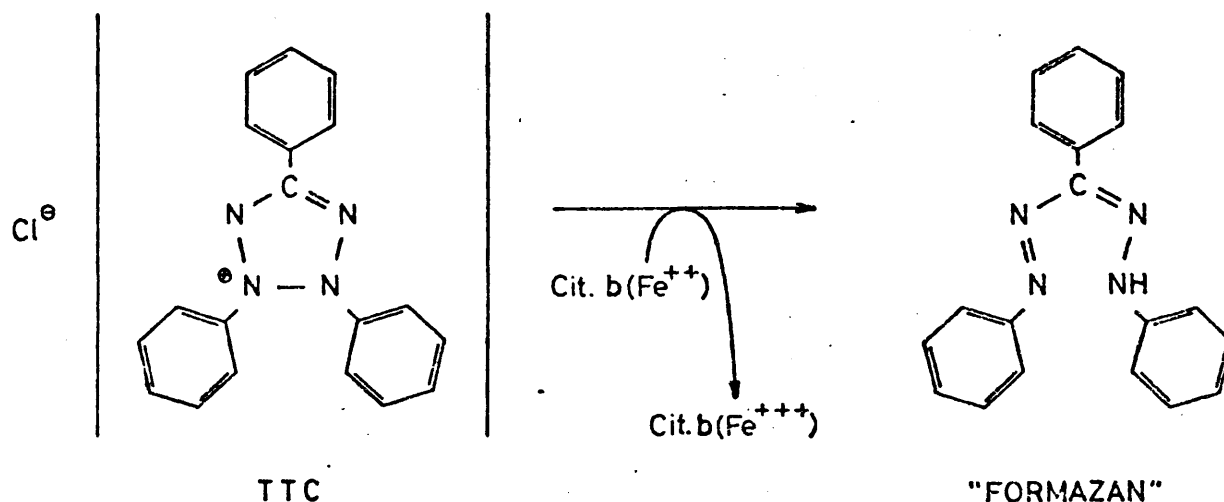
El calibrado del sistema, que consiste en la determina
ción del volumen total

$$V_t = V_g + V_f$$

para cada conjunto vaso-manómetro, se efectua rellorando --
los recipientes con Hg para, una vez determinada la masa --
del metal -- resultado de la media de varias pesadas --, deduci
cir el volumen requerido.

6 - VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE TRANSPORTE ELECTRO-
NICO.

En el transporte electrónico mitocondrial (vinculado, como es sabido, a la respiración, a diferencia del microsómico, vinculado a las oxidasas de función mixta y enzimas - de análoga significación), el paso que actúa como limitante de la velocidad del proceso es el que transcurre entre la coenzima Q y el citocromo b (Chance, 1954; Chance et al., 1955; Green, 1964). Puesto que la reducción del cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) es susceptible de acoplarse al --- transporte electrónico a este nivel, según el esquema adjunto, es usual la utilización de dicha reducción -- cuantificable por medida de la absorbancia a 490 nm propia del "formazán" formado -- en la evaluación de la actividad transportadora de la totalidad del sistema.



Siguiendo, con ciertas modificaciones, el método de Ogur et al. (1957), en el presente trabajo se llevó a cabo un estudio comparativo de la actividad transportadora de electrones en cultivos de Saccharomyces cerevisiae desarrollados sobre medio sólido — fuente de carbono: etanol al 3% — en presencia de 8 µg/cm² de distintos Aroclor.

Para ello se preparan y esterilizan en autoclave, por separado, en tampón fosfato 0,067 M a pH=7,5, una solución de agar no nutritivo al 1,5% y otra de TTC al 2% (la esterilización puede obviarse en ensayos de corta duración, como los que aquí se describen. Siempre que se lleva a cabo es preciso evitar la presencia conjunta, en la solución, del agar y el TTC, ya que éste experimenta la reducción a formazán si se somete al autoclave en tales condiciones). Una vez enfriadas a 55 °C, se mezclan ambas soluciones en las proporciones necesarias para que la concentración definitiva del TTC sea del 0,2% y se conservan a 50 °C, en estufa, hasta el momento de su adición a los cultivos.

A cada uno de éstos, después de un periodo de incubación de 70 - 80 horas a 26 °C, se añaden 20 ml de la solución agarizada de TTC y se deja en reposo, a temperatura ambiente, durante 3 - 4 horas, tiempo durante el cual se desarrolla la coloración roja del formazán.

Ensayados diferentes sistemas de disolventes para la extracción de este último, la mezcla acetona:tetracloroetileno (3:2, v:v), utilizada por Packard (1971) para fines similares, en relación con la actividad transportadora de ---

electrones en el fitoplancton marino, resultó ser la que -- proporcionó unas recuperabilidades más consistentes.

Así pues, una vez desarrollada la coloración, el sistema formado por ambos discos de agar, entre los cuales quedan incluidas las colonias del microorganismo, se homogeneiza durante tres minutos en un aparato Omni-Mixer con 10 ml de tampón fosfato 0,067 M (pH= 7,5) y 40 ml de la mezcla de extracción. El homogeneizado se centrifuga a continuación a baja velocidad (1000 g / 20 minutos) y, con una jeringa, se toma una alícuota de la fase orgánica -- inferior -- clarificada, sobre la que se mide la absorbancia a 490 nm frente a un blanco consistente en la mezcla de extracción.

Es preciso subrayar que con la metodología de extracción que se acaba de describir, no es posible lograr recuperabilidades superiores a ~ 60% con un grado de dilución -- adecuado. Los valores obtenidos, sin embargo, son altamente reproducibles a condición de homologar los volúmenes de la mezcla extractora y los tiempos de homogeneizado, por lo -- que, y siendo el objetivo fundamental de este estudio la -- comparación entre actividades de transporte electrónico en cultivos controles y dosificados con los distintos Aroclor, el método proporciona resultados perfectamente consistentes.

Asimismo se realizó una curva de calibrado a partir de una solución estandar de TTC en el tampón fosfato antes especificado, extrayéndose alícuotas de dicha solución, convenientemente diluidas, después de la reducción del TTC a formazán por adición de un exceso de ditionito sódico, con la --

mezcla acetona: tetracloroetileno. La relación obtenida entre absorbancia y concentración:

$$31,8 \text{ A } \frac{490 \text{ nm}}{1 \text{ cm}} \quad \times \quad 2,09 \text{ } \mu\text{mol} / \text{ml}$$

resulta consistente con la que dan Packard y Healy (1968), sobre la base de resultados de valoraciones realizadas por reducción coulombimétrica:

$$31,8 \text{ A } \frac{490 \text{ nm}}{1 \text{ cm}} \quad \times \quad 2,00 \text{ } \mu\text{mol} / \text{ml}$$

6.1 - ENSAYOS PARA LA DETECCION DE MUTANTES CON DEFICIENCIAS RESPIRATORIAS (EN Saccharomyces cerevisiae).

Llevados a cabo con objeto de investigar la posible actividad mutagénica de los PCBs en este sentido, el principio metodológico utilizado en tales ensayos es el mismo que el comentado en el apartado anterior: puesto que las células deficitarias en algún componente (s) esencial (es) de la cadena de transporte electrónico serán incapaces de reducir el cloruro de trifeniltetrazolio, al sembrar -- con un grado de dilución adecuado -- una población celular sobre un medio sólido que permita el desarrollo de los mutantes (un medio fermentable) y tratar el cultivo, en el momento en -- que las colonias sean perceptibles a simple vista, con una solución agarizada y tamponada de trifeniltetrazolio según la técnica ya descrita (Ogur et al., 1957), las colonias -- desarrolladas a partir de células mutantes ("aer") permanecerán incoloras, mientras que las originadas por células -- respiratorio-suficientes ("AER") adquirirán la coloración roja propia del formazán.

En el presente trabajo, dicho test se aplicó a poblaciones celulares procedentes de cultivos de Saccharomyces cerevisiae en medio líquido, después de un periodo de incubación de 20 horas, en presencia de 25 ppm de los Aroclor de 32, 42, 48, 54 y 60% de grado medio de cloración.

Separadas las células del medio por centrifugación, se lavan dos veces con medio fresco y estéril, y se resuspenden en un volumen adecuado del mismo, de tal modo que el inóculo que se adiciona a cada placa de medio sólido sea portador de 80 - 150 células.

Transcurrido un periodo de incubación de 70 - 80 horas a 26 °C, se adiciona la capa de agar - TTC y, después de 3 - 4 horas, se lleva a cabo el recuento de colonias "aer" y "AER" frente a cultivos control desarrollados y tratados en idéntica forma (existe una frecuencia normal de producción de mutantes "aer" que cae dentro de los límites de detección de este procedimiento).

B.II - R E S U L T A D O S

Y S U

I N T E R P R E T A C I O N

1 - LOS PCBs COMO ESTRUCTURAS ALTAMENTE RESISTENTES A LA ACCION METABOLICA DE LOS MICROORGANISMOS.

Al ser el Aroclor - 1254 la mezcla comercial de bifenilos policlorados más abundantemente utilizada en los estudios sobre la dinámica ambiental de tales compuestos, fué la primeramente ensayada frente a Penicillium funiculosum, Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger y Aspergillus flavus desarrolladas sobre medio de Czapek sólido.

Enningún caso, y a ninguna de las concentraciones de A - 1254 probadas - 2, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, depositados tal como se describió en el apartado correspondiente - se detectaron alteraciones en la composición del xenobiótico, que, al final de los periodos de incubación, se recupera intransformado de los cultivos en proporciones que, teniendo en cuenta los factores de recuperabilidad - superiores al 90% - resultan idénticas a las cantidades añadidas.

Según puede apreciarse en la fig. 12, que muestra un caso representativo de todos los demás, los perfiles cromatográficos producidos por una solución estandar de Aroclor - 1254 y por un extracto de un cultivo adicionado con la misma mezcla, resultan iguales. La señal adicional que aparece en el segundo cromatograma y que solapa en parte a la debida a uno de los componentes del Aroclor, constituye únicamente una impureza del extracto, que desaparece por tratamiento de una alícuota de 2 ml de éste con una gota de áci-

- A -

- B -

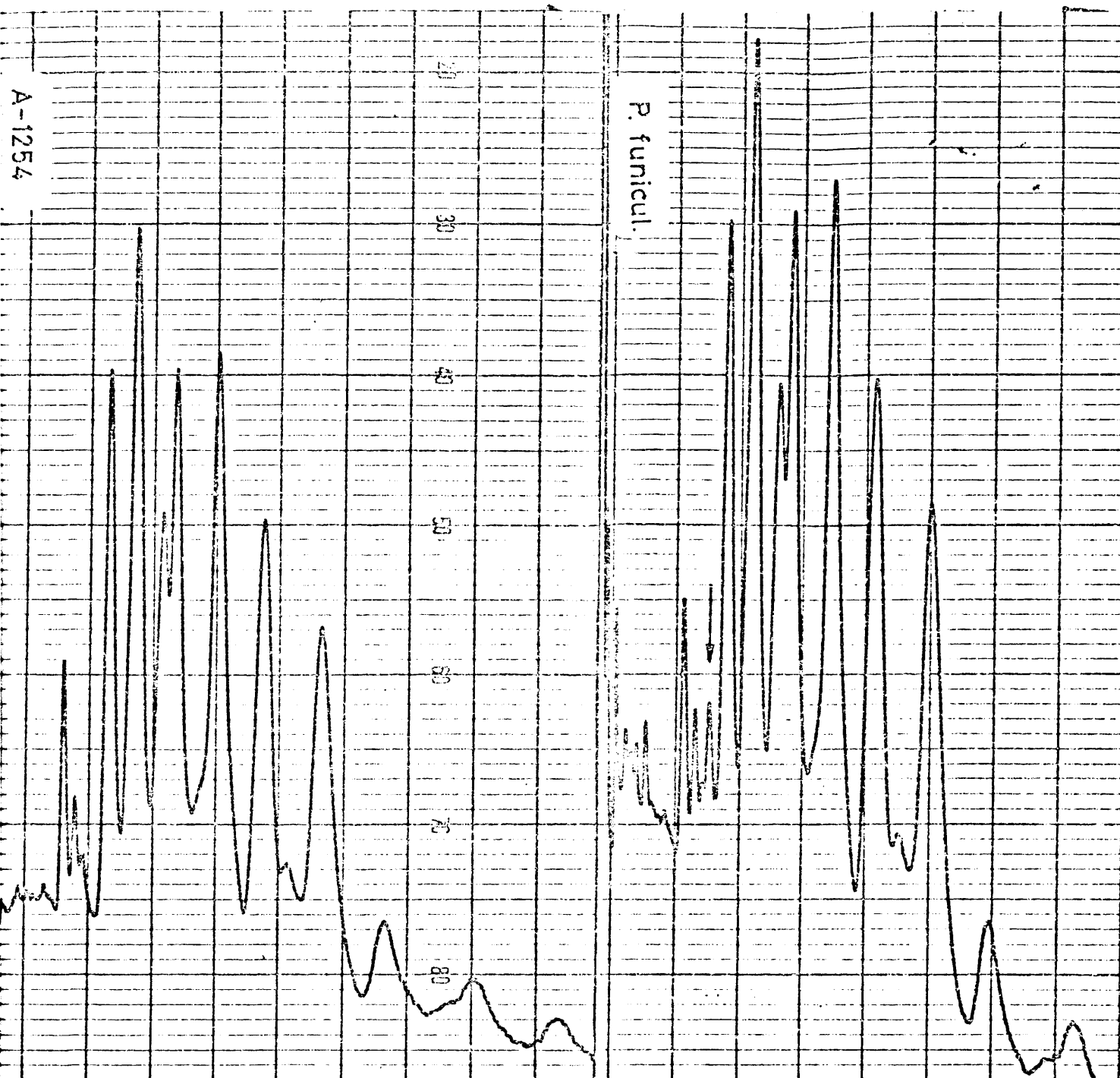


Fig. 12 - Cromatogramas de Aroclor-1254. A: solución estándar o patrón. B: extracto recuperado de un cultivo de Penicillium funiculosum sobre medio de Czapek sólido, adicionado con $10 \mu\text{g} / \text{cm}^2$, después de un periodo de incubación de 200 horas.

do sulfúrico 60%, restableciéndose el perfil estandar. La contribución algo menor de las primeras señales a la superficie total, que también se constata en este cromatograma, se da asimismo en los extractos de placas adicionadas con las mismas proporciones de Aroclor-1254 y mantenidas en condiciones estériles durante un periodo de tiempo equivalente al de incubación. El fenómeno debe, pues, atribuirse a pérdidas por volatilización — lo más probable — o algún otro mecanismo de tipo fisico-químico; pero no a la acción de los microorganismos.

Análogos resultados se obtuvieron con las mismas especies cultivadas en medio líquido frente a los Aroclor 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260 a las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 ppm (las figuras 13 de la a a la e recogen ejemplos representativos de cada uno de los Aroclor), así como la levadura Saccharomyces cerevisiae, cultivada tanto en medios fermentables como no fermentables.

Aun contrastando con los resultados obtenidos por otros autores que trabajaron con diferentes entidades biológicas, la anterior constatación no parece demasiado sorprendente. En efecto, el incremento en los niveles residuales de PCBs en tejidos de diversas especies silvestres que en los últimos años viene siendo detectado por numerosos autores (véase Hernandez, 1976, para datos en torno a este tema, referidos a España), acusa, sin lugar a dudas, la escasa capacidad degradativa que los mecanismos biológicos poseen frente a este tipo de moléculas. Es de notar, asimismo, que en tales estudios constituye la norma el que los perfiles --

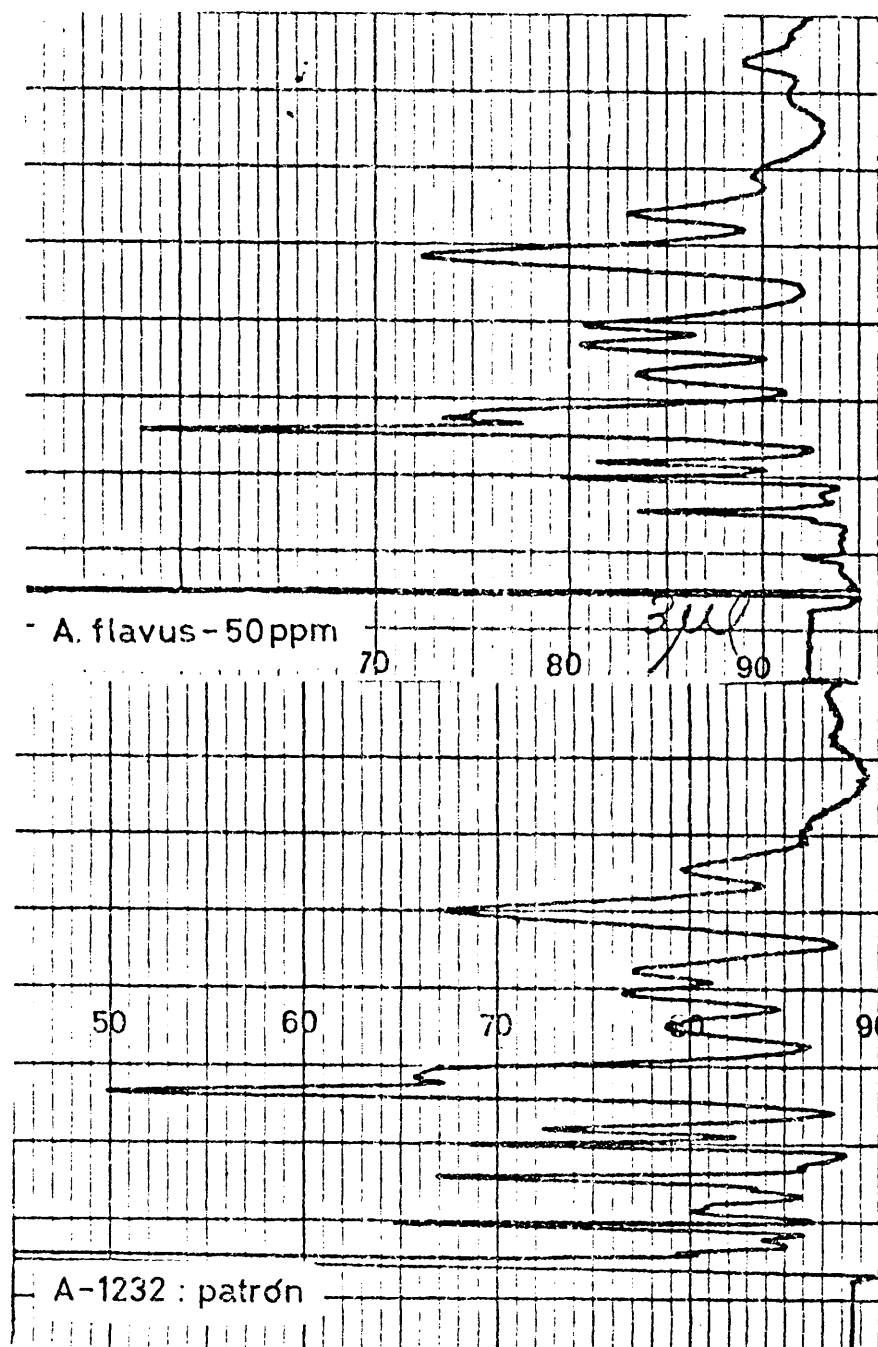


Fig. 13 a - Cromatogramas de Areclor-1232, procedentes de soluciones estandar y extracto de A. flavus - en medio líquido -, respectivamente.

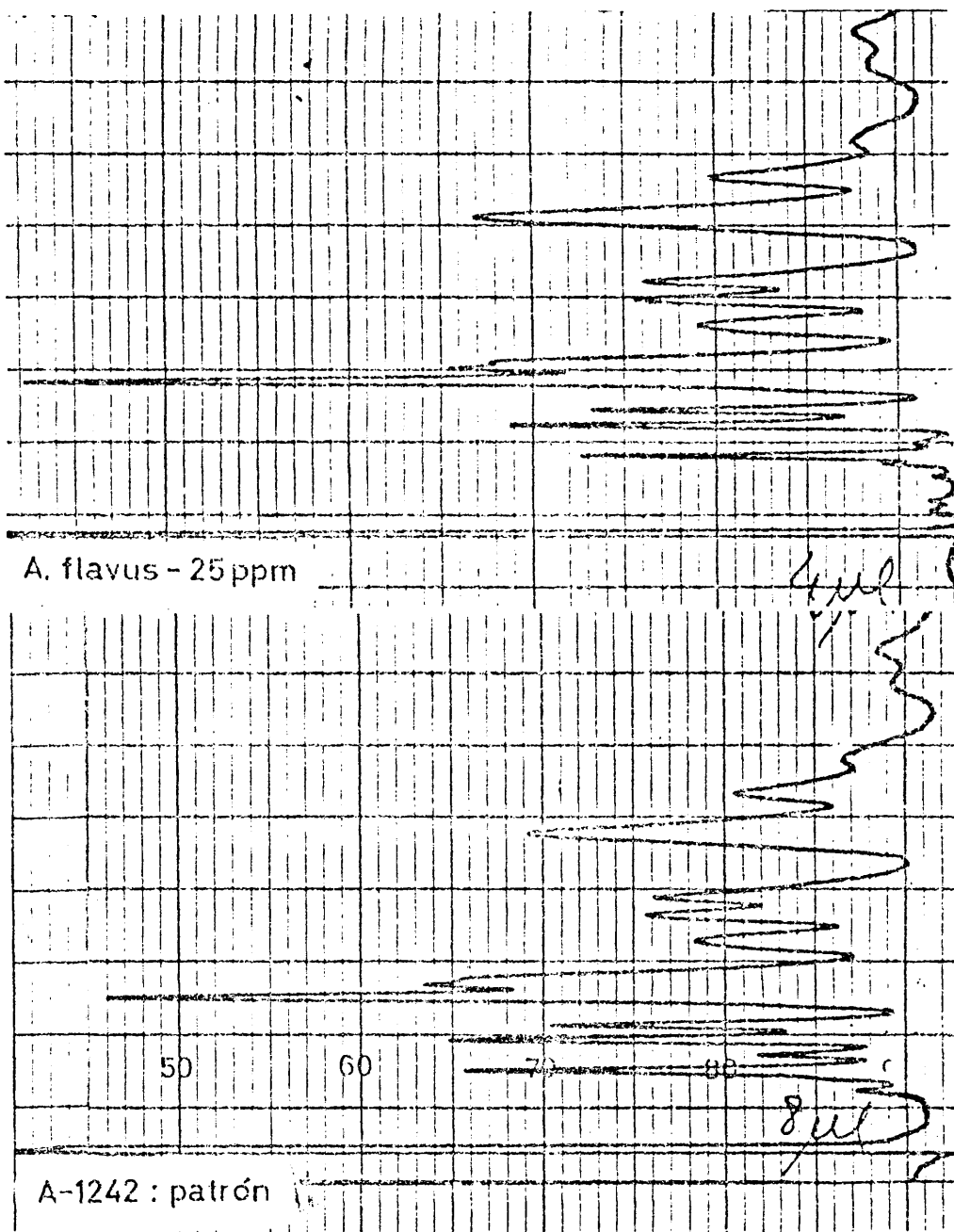


Fig. 13 b - Cromatogramas de Aroclor-1242, procedentes de soluciones estándar y extracto de A. flavus - en medio líquido -, respectivamente.

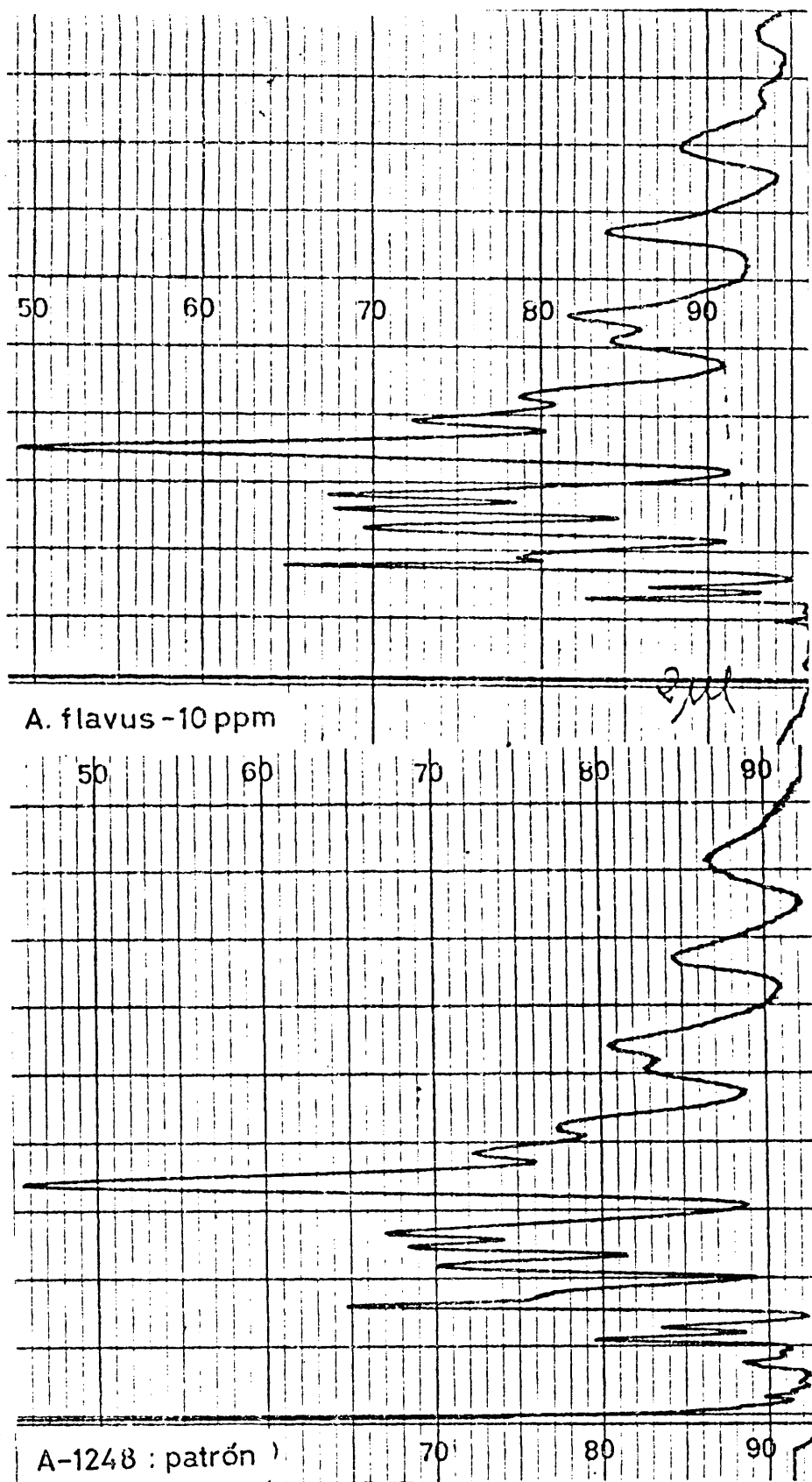


Fig. 13 c - Cromatogramas de Aroclor-1248, procedentes de soluciones estandar y extracto de A. flavus - en medio líquido -, respectivamente.

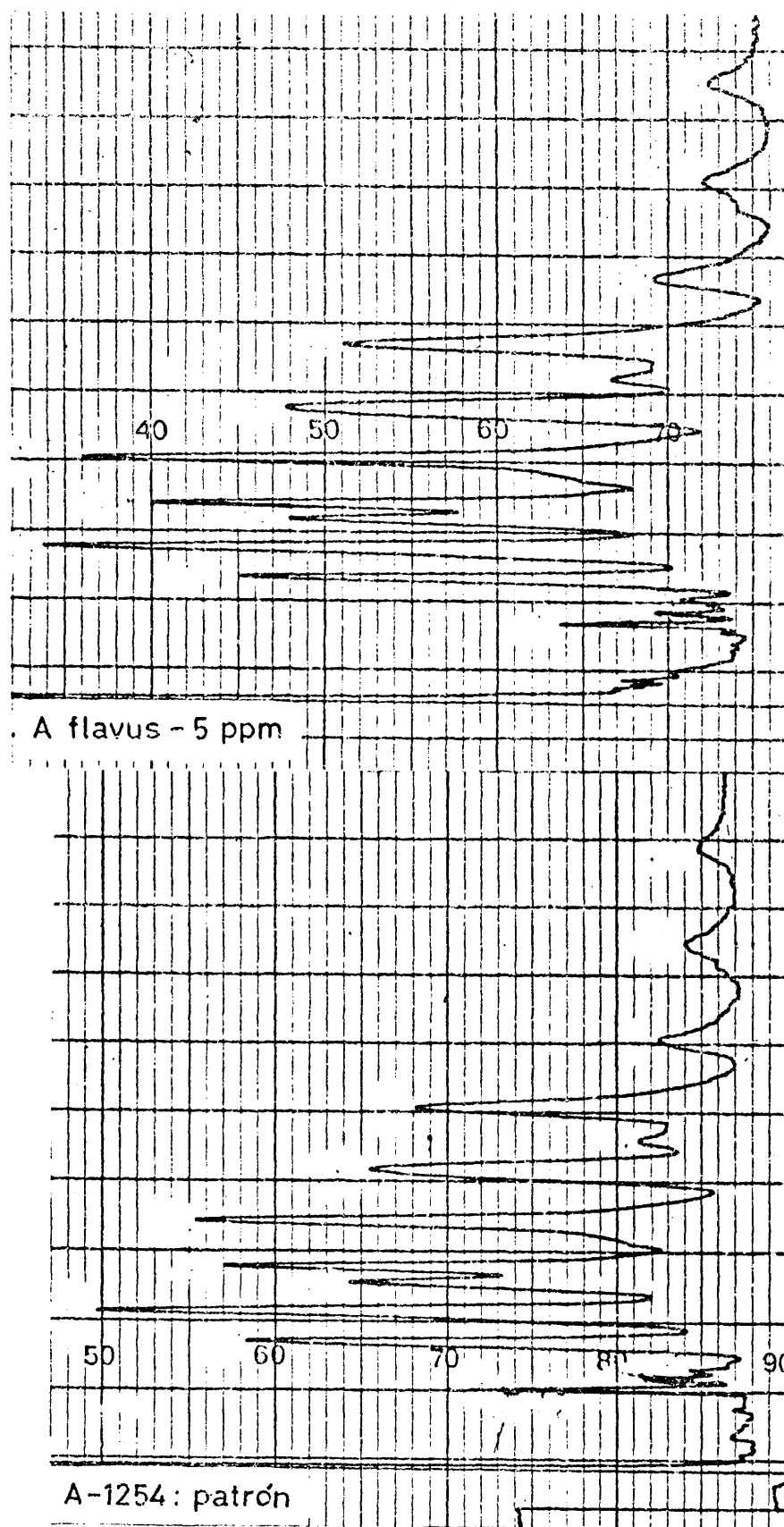


Fig. 13 d - Cromatogramas de Aroclor-1254, procedentes de soluciones estándar y extracto de A. flavus - en medio líquido -, respectivamente.

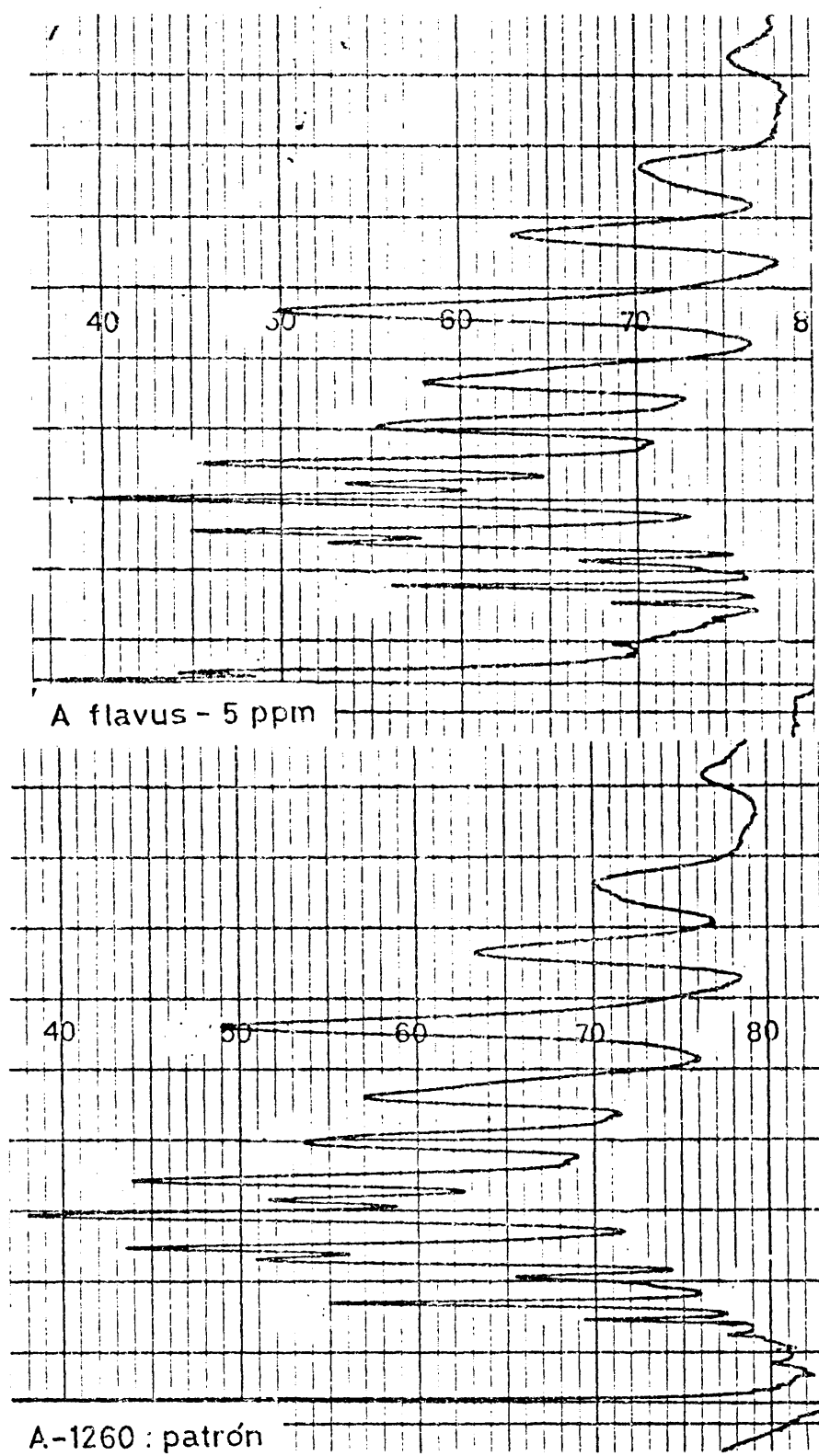


Fig. 13 e - Cromatogramas de Aroclor-1260, procedentes de soluciones estandar y extracto de A. flavus - en medio líquido -, respectivamente.

cromatográficos de los extractos de tejidos se asemejen extraordinariamente — e incluso resulten idénticos — a los de una solución estandar de Aroclor-1254, o una mezcla equi-ponderal de Aroclor-1254 y Aroclor-1260.

Por otra parte, la gran mayoría de las referencias a transformaciones metabólicas de los PCBs (Moza et al., 1974; Greb et al., 1975 a; 1975 b; entre otras) aluden a transformaciones más o menos "superficiales": hidroxilaciones — preferentemente en bifenilos con bajo grado de cloración — sobre carbonos insustituídos, cuya velocidad de formación metabólica, según confirman Jensen y Sundström (1974) trabajando en ratas, depende del número de cloros y su distribución por anillo, quedando favorecida al máximo cuando --- existen dos átomos de carbono adyacentes insustituídos. Ni la pérdida de átomos de cloro, ni menos aún la ruptura de los anillos, pueden considerarse mecanismos metabólicos --- usuales — sino más bien excepcionales — pese a los resultados, ya comentados, de Kaiser et al. (1974).

No obstante, es preciso convenir que la total ausencia de transformaciones puesta de manifiesto en el presente trabajo, incluso en el caso del Aroclor-1232 -- mezcla cuyo -- grado de cloración corresponde al que presenta un diclorobifenilo --, podría calificarse de inesperada.

Es evidente que carece de realismo extrapolar los resultados obtenidos con cuatro especies a toda la microflora fúngica del suelo, pero a la luz de lo que sucede con otros xenobióticos, cabe también suponer en este caso que muchas

especies más de *Aspergillus* y *Penicillium* serán asimismo in capaces de ejercer efectos degradativos sobre -- al menos -- un cierto número de bifenilos policlorados. Que ello ocurra al nivel fúngico, que en la naturaleza es precisamente el -- principal responsable de los primeros pasos de la degradación de los hidrocarburos, da una idea de las profundas repercusiones ambientales a que puede dar lugar la utilización indiscriminada de PCBs.

2 - EL PROCESO DE ACUMULACION DE LOS PCBs.

Después de las constataciones señaladas en el capítulo anterior, la totalidad del trabajo experimental subsiguiente se llevó a cabo con exclusividad sobre las especies Aspergillus flavus y Saccharomyces cerevisiae.

La primera de ellas fué seleccionada en base a que, -- tal como pusieron de manifiesto los retrasos en la esporulación -- en medio sólido -- y los efectos sobre el peso seco -- del micelio -- en medio líquido --, resultó, de las cuatro Aspergillaceae ensayadas, la más sensible a la acción de los PCBs (hay que señalar, no obstante, que las diferencias de susceptibilidad entre todas ellas, al menos dentro del rango de concentraciones utilizado y según los criterios anteriores, presentaron escasa significación). La segunda, como ya se mencionó, en base a las posibilidades que su particular fisiología ofrece a la investigación de la incidencia -- de los PCBs sobre el metabolismo energético.

En lo que se refiere a la acumulación de los PCBs por ambos microorganismos -- cultivados en medios líquidos --, cabe destacar en primer término que ninguno de los componentes individuales de las mezclas objeto de estudio es concentrado de modo selectivo o preferencial. La conservación, en los extractos de cultivos, del perfil cromatográfico característico de las soluciones estandar de los distintos Aroclor, hecho que en el capítulo anterior se comentó en rela-

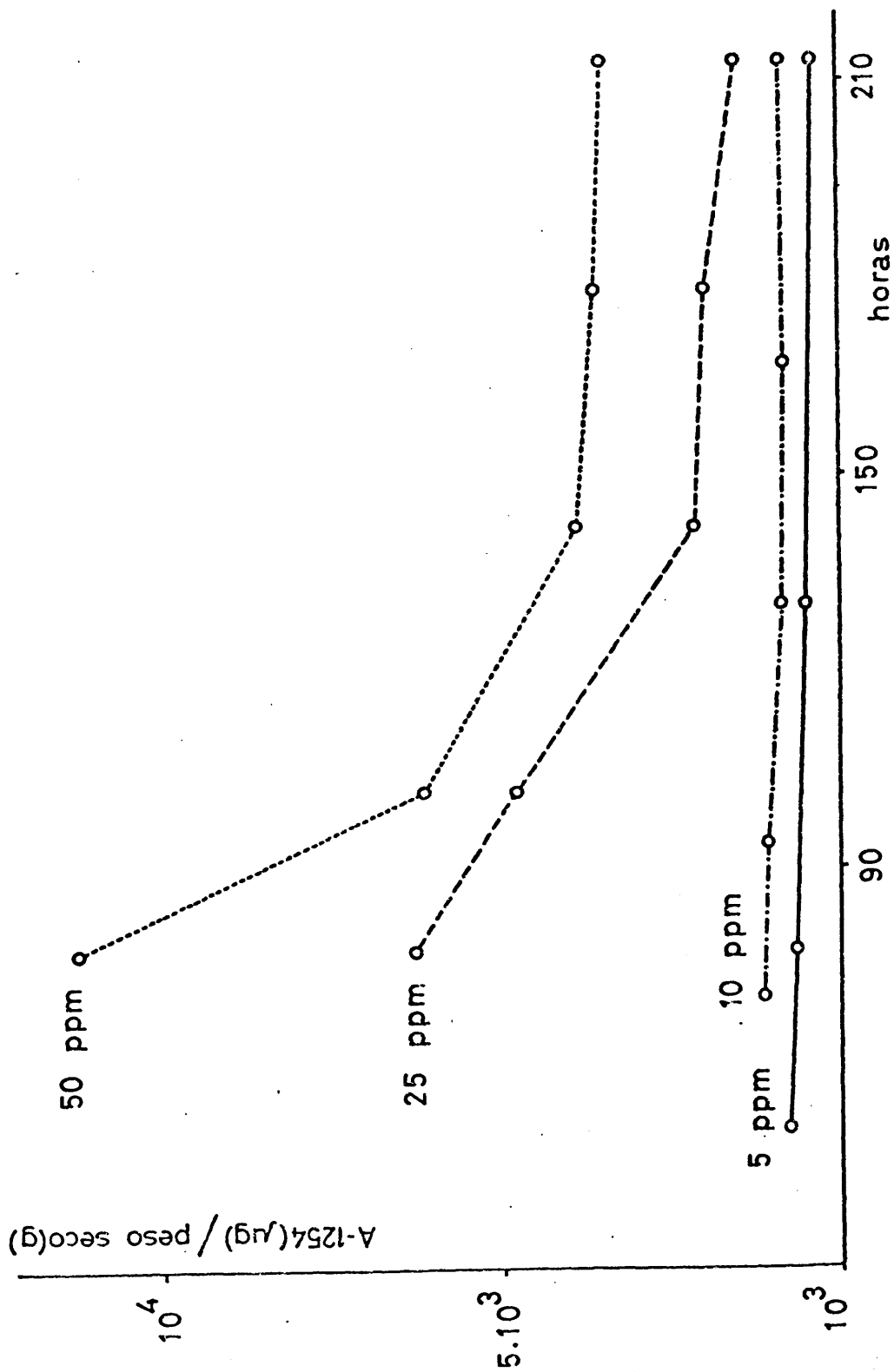


Fig. 14 - Niveles de Aroclor-1254 en micelio de *Aspergillus flavus* a lo largo del período de incubación, para diferentes concentraciones iniciales de xenobiótico.

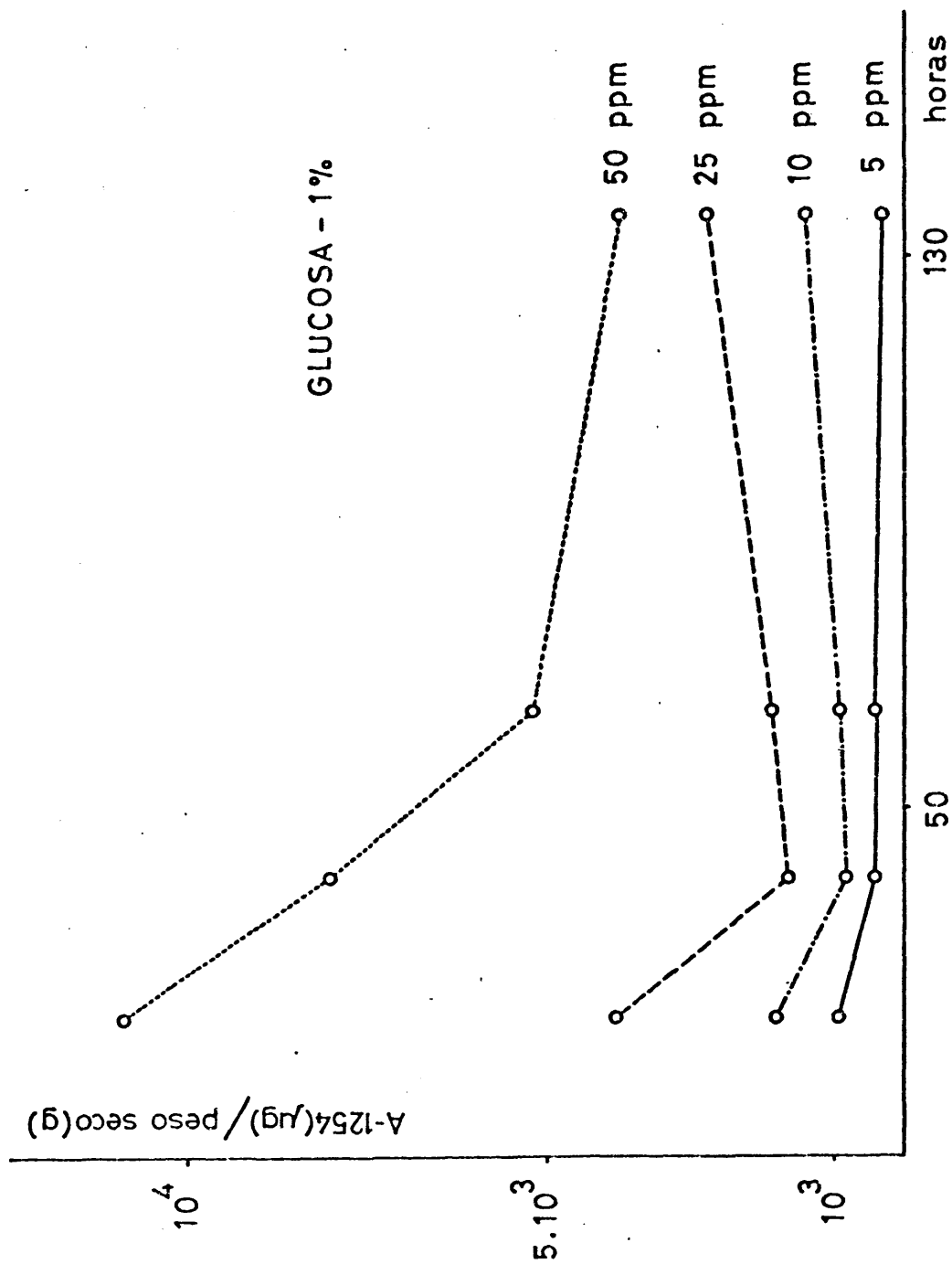


Fig. 15 - Niveles de Aroclor-1254 en células de Saccharomyces cerevisiae a lo largo del periodo de incubación, para diferentes concentraciones iniciales de xenobiótico.

ción con la resistencia de los PCBs a la acción metabólica, pone asimismo de manifiesto esta última particularidad del proceso de bioconcentración (figs. 13 a - e. No se reproducen los cromatogramas correspondientes al Saccharomyces cerevisiae por ser, como ya se dijo, enteramente análogos).

Por otra parte, si se examina la evolución de los niveles de A-1254 en micelio de A. flavus - o células de S. cerevisiae - a lo largo del periodo de incubación (figs. 14 y 15), se constata que, de un modo muy similar en ambos casos, los valores máximos se registran en las primeras etapas del cultivo, tendiendo gradualmente a alcanzarse un nivel de estabilización a medida que la biomasa aumenta. Durante todo el proceso, los valores alcanzados se encuentran estrechamente relacionados con la concentración inicial de xenobiótico adicionada a los cultivos.

Todo parece indicar, pues, que la mayor parte del xenobiótico añadido es concentrado a notable velocidad por la biomasa en crecimiento, "diluyéndose" ulteriormente en ella a medida que esta aumenta.

En efecto, definiendo de acuerdo con Johnson y Kennedy (1973), el factor de bioconcentración (F_b) como la relación entre el nivel de xenobiótico en la biomasa y la dosis inicial añadida al medio, los valores de dicho parámetro, tanto en cultivos de A. flavus como de S. cerevisiae en medio fermentable (tabla V) disminuyen gradualmente a lo largo del periodo de incubación hasta alcanzar, hacia el final de dicho periodo, un nivel sustancialmente independiente de

Tabla V - Valores del factor de bioconcentración (B_b), a lo largo del periodo de incubación, en cultivos de Aspergillus flavus y Saccharomyces cerevisiae (Glucosa - 1%), adicionados con diferentes concentraciones de Aroclor - 1254.

<u>Aspergillus flavus</u>			<u>Sacch. cerevisiae</u>	
<u>Edad</u> <u>(horas)</u>	<u>F_b</u>	<u>Dosis</u> <u>(ppm)</u>	<u>F_b</u>	<u>Edad</u> <u>(horas)</u>
78	119,49	5	179,22	20
"	127,66	10	189,99	"
"	218,25	25	192,23	"
"	225,89	50	218,37	"
130	100,88	5	82,80	40
"	105,93	10	98,14	"
"	142,46	25	104,88	"
"	132,40	50	160,00	"
178	70,03	5	80,50	64
"	82,06	10	76,14	"
"	83,67	25	96,38	"
"	72,65	50	100,15	"
213	59,99	5	72,80	130
"	65,15	10	74,38	"
"	68,19	25	83,95	"
"	71,06	50	85,79	"

la concentración inicial.

Por lo que respecta a la naturaleza del proceso acumulativo, cabe pensar que, en lo esencial, viene determinado por mecanismos pasivos de ingreso — adsorción, reparto agua/lípidos celulares — más que por procesos de transporte activo. Efectivamente, incubando A. flavus en presencia de 5, 10, 25 y 50 ppm de los Aroclor de 32, 42, 48, 54 y 60 % de cloración media, y extrayendo el micelio a las 200 horas -- (cuando todos los cultivos se encuentran en las proximidades del punto de cosecha máxima y los niveles de xenobiótico se han estabilizado), las concentraciones detectadas se hallan linealmente correlacionadas (fig. 16; grado de significación superior al 99%) con un índice "I", obtenido -- por multiplicación de los porcentajes medios de cloración -- de los Aroclor empleados, por las correspondientes concentraciones iniciales (así en un cultivo adicionado con 5 ppm de Aroclor-1232, "I" = $5 \times 32 = 160$, etc.).

Sin que tales resultados excluyan forzosamente la intervención de mecanismos de transporte activo o facilitado, es claro, sin embargo, que son altamente coherentes con la hipótesis de que en el proceso de bioconcentración de los PCBs, el coeficiente de reparto agua/lípidos constituye un factor de importante significación. Y es probablemente por ello que, dada la elevada lipofilia de los PCBs en general, no existan diferencias detectables en la acumulación de los distintos componentes de un Aroclor determinado.

Por otra parte, las diferencias en el potencial de bio

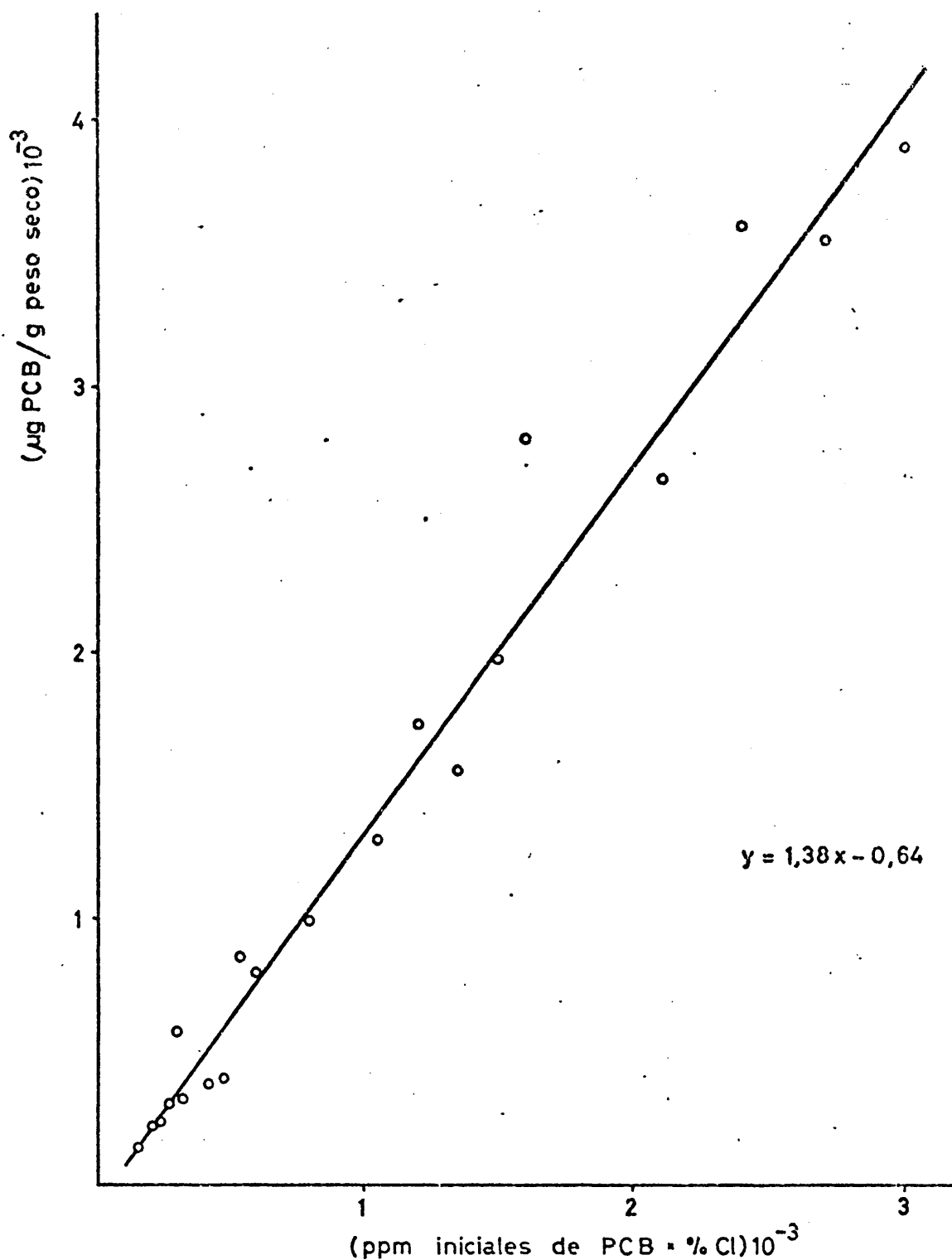


Fig. 16 - Correlación entre acumulación de diferentes Aroclor, a diferentes concentraciones iniciales, e índice "I", en cultivos de A. flavus. Coeficiente de correlación: 0,985. (Para explicación, véase el texto).

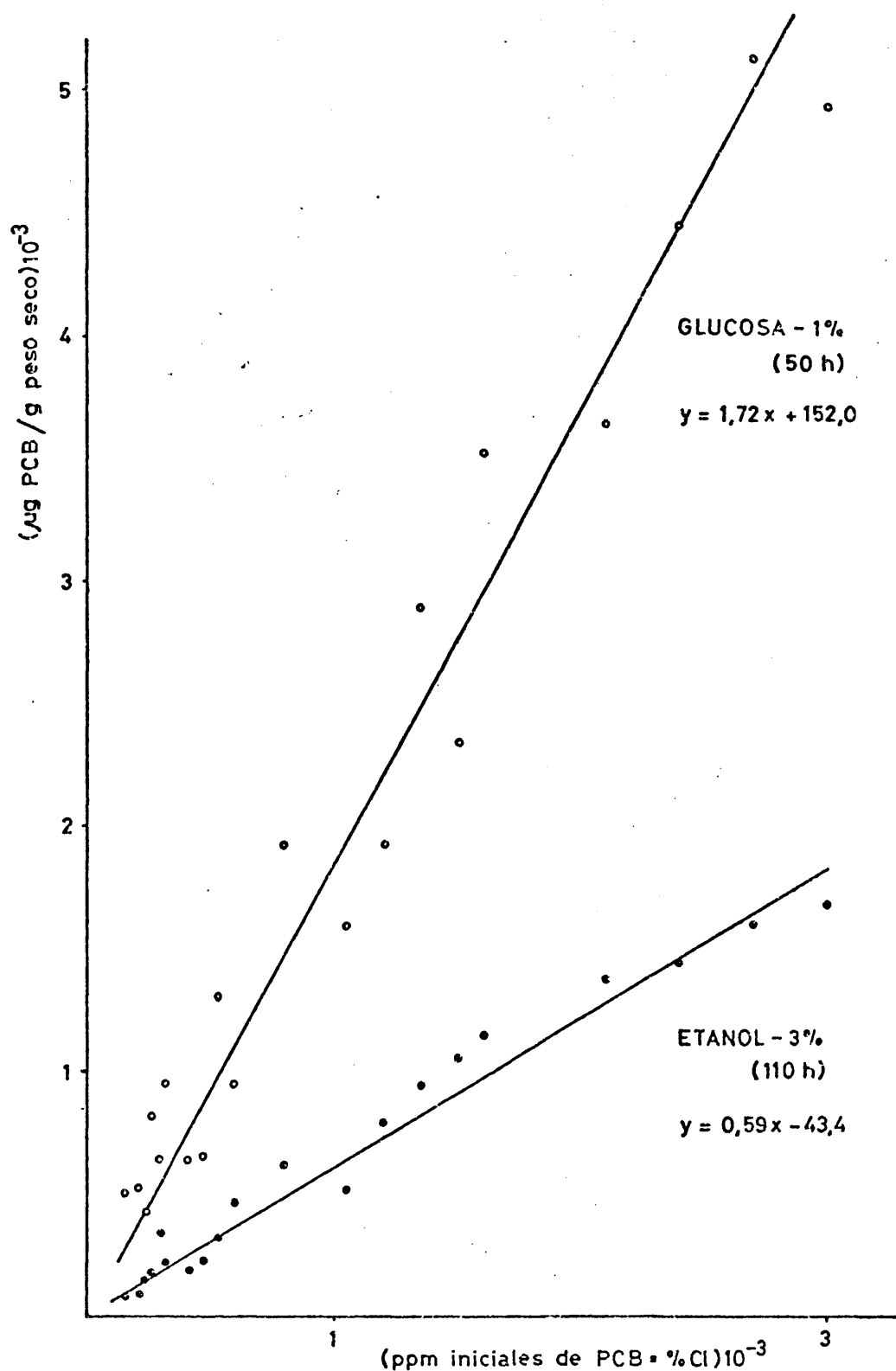


Fig. 17 - Correlación entre acumulación de diferentes Aroclor, a diferentes concentraciones iniciales, e índice "I", en cultivos de S. cerevisiae. Coeficientes de correlación, respectivamente: 0,980 y 0,984. (Para explicación, véase el texto).

concentración que se ponen de manifiesto en cultivos de S. cerevisiae -- adicionados con PCBs en modo análogo al que -- se acaba de describir para A. flavus -- desarrollados a expensas de fuentes de carbono fermentables y no fermentables (fig. 17), deben explicarse en función de la superior biomasa de la cosecha máxima que el microorganismo produce en -- etanol - 3% frente a glucosa - 1%, la superior velocidad -- con que se desarrolla en este último medio, y la diferencia en el coeficiente de reparto medio / células de los PCBs, -- que favorece su acumulación en mayor medida en el caso del medio fermentable.

Debe subrayarse, no obstante, que pese al importante papel que parecen desempeñar los procesos de reparto en la -- acumulación de los PCBs, no cabe descartar la intervención de mecanismos de adsorción. Así, en cultivos en medio líquido de los dos microorganismos tratados en este capítulo, dosificados con distintas concentraciones de los Aroclor ensayados, las concentraciones de xenobiótico halladas en material biológico y medio después de la estabilización, satisfacen con un significativo grado de ajuste (>95%) la -- ecuación de Freundlich:

$$C = K c^{1/n} \quad \left(\log C = \frac{1}{n} \log c + \log K \right)$$

en la que C y c son las concentraciones mencionadas en material biológico y medio, respectivamente, una vez alcanzado el equilibrio.

Más difícil y cuestionable resultaría la interpreta-

Tabla VI - Constantes de Freundlich, obtenidas a partir de cultivos de Aspergillus flavus y Saccharomyces cerevisiae dosificados con concentraciones variables (5, 10, 25 y 50 ppm) de los diferentes Aroclor.

	Aspergillus flavus			Saccharomyces cerevisiae		
	(160 horas)			GLUCOSA - 1% (50 h)		
	1/n	K (ml. μg^{-1})		1/n	K (ml. μg^{-1})	
A-1232	1,427	1,0. 10^{-5}		0,712	3,01. 10^{-4}	1,555 2,1. 10^{-5}
A-1242	1,193	3,0. 10^{-5}		0,720	3,24. 10^{-4}	1,304 1,8. 10^{-5}
A-1248	0,984	5,0. 10^{-5}		0,940	2,06. 10^{-4}	1,218 2,0. 10^{-5}
A-1254	0,733	20,0. 10^{-5}		0,779	6,38. 10^{-4}	0,943 6,4. 10^{-5}
A-1260	1,091	18,0. 10^{-5}		0,706	6,55. 10^{-4}	0,723 12,4. 10^{-5}

ción, sobre la base de las constantes de Freundlich obtenidas (table VI), de la posible influencia del grado de cloración sobre el proceso de adsorción, ya que, en cualquier caso, es obvio que los valores experimentales de C vienen --- afectados por la influencia de los mecanismos de reparto. Sí podría señalarse que los valores más altos de K se alcanzan en cultivos de Saccharomyces cerevissiae desarrollados en medios con fuente de carbono fermentable, pero tampoco - en este caso es lícito decidir que el hecho se sustente en particularidades del correspondiente proceso de adsorción.

3 - EFECTOS DE LOS PCBs SOBRE EL DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS ENSAYADOS.

En relación, primeramente, con características morfológicas bien manifiestas a nivel de mera observación macroscópica, cabe destacar que, sobre medio de Czapek agarizado, - la presencia de PCBs determina en la totalidad de los Ascomicetos que se ensayaron un sensible retraso en la esporulación que, además de guardar una relación - aparentemente de tipo logístico - con la dosis aplicada, se intensifica gradualmente con el descenso en el grado medio de cloración -- del Aroclor adicionado al sustrato.

Por otra parte, en los cultivos en medio líquido - donde, como es sabido, el mantenimiento de una agitación constante lleva usualmente a un desarrollo de los micelios fúngicos en forma de aglutinados esferoidales - los efectos de los PCBs sobre el diámetro medio de dichos aglutinados resultan extraordinariamente aparentes. De nuevo aquí la respuesta fúngica, que aunque no se ha cuantificado es evidente que permitiría una aproximación biométrica, guarda una estrecha relación con la dosis y el grado de cloración de los Aroclor: dentro de cada Aroclor el diámetro aumenta -- con la dosis, y a dosis equivalentes de distintos Aroclor, aumenta a medida que desciende el grado de cloración.

Aunque no resulta sencillo hallar una razón concreta que pueda explicar este último efecto de un modo plenamente

te satisfactorio, es muy probable que se encuentre vinculado a la problemática del intercambio de gases entre el microorganismo y el medio.

El campo de la microbiología industrial, en efecto, suministra diversos ejemplos ilustrativos a este respecto, -- que ponen de manifiesto la influencia de la aireación y distribución de su flujo sobre el grado de agregación de la biomasa en crecimiento. Si en el caso aquí estudiado, un aumento de la toxicidad implicase unas mayores necesidades en el consumo de oxígeno -- circunstancia que, como se verá en capítulos subsiguientes, parece suficientemente demostrada --, el menor grado de agregación adquirido por los micelios desarrollados en los cultivos adicionados con los xenobióticos, podría interpretarse como adaptación del microorganismo a unos valores elevados de flujo de gases.

Respecto al empleo de la acetona como disolvente portador de los distintos tipos de compuestos organoclorados que se manipularon a lo largo de este trabajo, conviene señalar que se evidenció un claro efecto estimulante de aquel disolvente sobre el desarrollo de Aspergillus flavus. Si bien el problema no se trató en profundidad, en vista de la relativa importancia en el incremento del peso seco que corresponde a un incremento en la concentración de acetona entre límites tan moderados como 0,2 - 0,4%, cabría sugerir -- que el efecto observado no parece explicable únicamente en base a la utilización del disolvente como fuente adicional de energía por parte del microorganismo.

En cualquier caso, tal circunstancia obliga a homologar de modo muy estricto las concentraciones de acetona añadidas a todos los cultivos de cada serie de ensayos. Por otra parte, todos los resultados relativos a "controles" que figuran en la presente memoria, deben entenderse como obtenidos sobre cultivos desarrollados en presencia de una dosis inicial de acetona equivalente al 0,4% (v : v) del volumen de medio empleado.

3.1 - DESARROLLO DE Aspergillus flavus EN PRESENCIA DE AROCLOR - 1254 : LA APROXIMACION DOSIS - RESPUESTA (PESO SECO Y NIVELES RELATIVOS DE RNA).

La necesidad de describir de un modo más preciso la -- respuesta fúngica a los PCBs, y dada la aparente relación -- entre aquella y la dosis de xenobiótico, llevó a investigar cuantitativamente dicha relación desde un punto de vista -- toxicológico clásico, seleccionando a este objeto el Aspergillus flavus (especie más sensible de las ensayadas, aunque, como ya se indicó, con escasa diferencia sobre los demás Ascomicetos) y el Aroclor-1254 (mezcla de bifenilos policlorados a cuyo perfil cromatográfico se asemejan más frecuentemente los producidos por extractos de muestras ambientales).

Es preciso señalar aquí que la aplicación de los tests dosis-respuesta usuales en los ensayos toxicológicos a cultivos cerrados de microorganismos adicionados con xenobioticos del tipo de los estudiados en este trabajo, no está libre de ciertos importantes problemas.

En primer lugar se encuentra el hecho de que, según todas las apariencias, no es una letalidad comparable a las producidas por los agentes o tratamientos antimicrobianos típicos, como los antisépticos, el calor o las radiaciones, lo que en este caso se ha de cuantificar. Se trata más bien

de una disfunción subletal -- o una cadena de disfunciones -- que, más que una tasa determinada de mortalidad, origina retardos en el desarrollo, reajustes metabólicos, etc., cuya dinámica no suele encajar en las interpretaciones clásicas del tema (curvas efectividad-tiempo, por ejemplo).

De otro lado, resulta evidente que si el xenobiótico -- ensayado determina retardos en el desarrollo de una población microbiana sometida a la conocida sucesión de fases: latencia-exponencial-estacionaria-decaimiento, una toma de muestras sincrónica en una serie de cultivos (controles y tratados a diferentes dosis), puede significar, de hecho, una serie de cortes en los que se comparen estados fisiológicos diferentes y, por lo tanto, esencialmente no comparables.

Con estas limitaciones en mente, y después de ensayar previamente un intervalo más amplio de dosis, se procedió a estudiar la curva de desarrollo de Aspergillus flavus frente a 5, 10, 25 y 50 ppm de Aroclor-1254, con los resultados, por lo que respecta al peso seco, que se reproducen en la fig. 18.

(Debe advertirse que los valores de peso seco representan promedios de cosechas completas, a los tiempos correspondientes, de cultivos de 50 ml en erlenmeyer de 250 ml. Las inexactitudes que, dado el tipo de crecimiento de los microorganismos filamentosos, introduciría la toma de alícuotas de un mismo cultivo, obliga a este otro tipo de muestreo, lo cual implica, naturalmente, que los puntos que de-

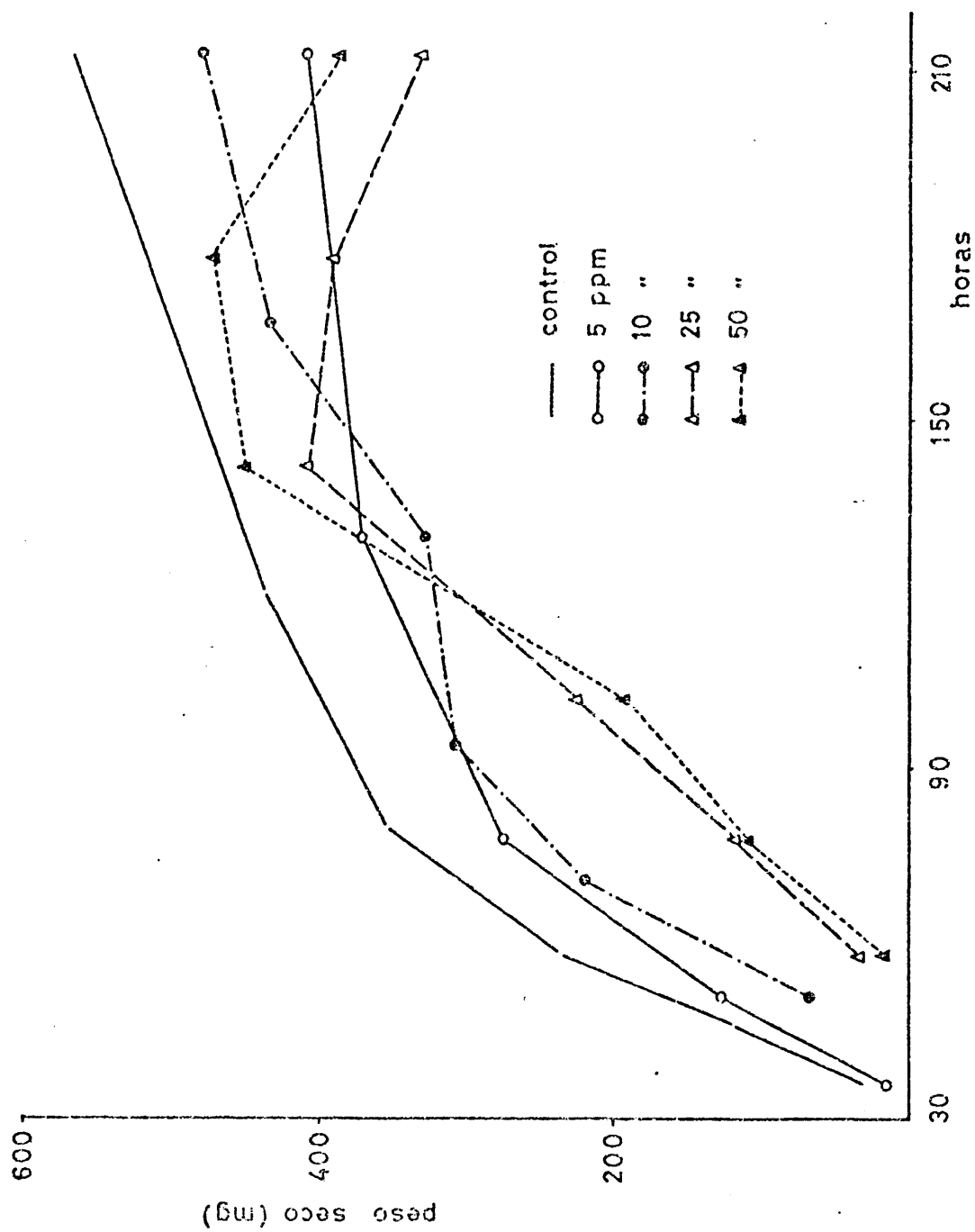


Fig. 18 - Desarrollo de Aspergillus flavus en presencia de diferentes concentraciones iniciales de Arcclor-1254.

finen cada curva proceden de distintos replicados de cultivos iniciados en idénticas condiciones).

Dicha fig. 18 pone de manifiesto que, si bien la depresión producida por la presencia del xenobiótico se deja notar a lo largo de todas las fases del cultivo, es aproximadamente dentro de las primeras 100 horas, es decir, a lo largo de la fase de crecimiento exponencial, que tal depresión se manifiesta con una regularidad que permite un tratamiento coherente en términos cuantitativos. Una vez alcanzada la fase en que los nutrientes ejercen ya un efecto limitante del desarrollo, y pese a que los cultivos tratados con el Aroclor-1254 no llegan a alcanzar las cotas de los controles, la influencia del xenobiótico resulta ya más confusa.

A la vista de los resultados obtenidos en torno a la dinámica de la acumulación de los PCBs, y demostrada la incapacidad del microorganismo para una acción metabólica sobre los mismos, atribuir este decaimiento progresivo en la intensidad del efecto tóxico simplemente a la dilución que se opera en la biomasa en crecimiento, parece más razonable que acudir a razones de índole adaptativa.

Análogo comportamiento, aunque con una dinámica todavía más acusada, presenta la variación en los niveles relativos de RNA durante el transcurso del periodo de incubación (fig. 19). La notable estimulación en la biosíntesis de este componente que, a lo largo de la fase de crecimiento exponencial, ejerce la presencia de Aroclor-1254, decae

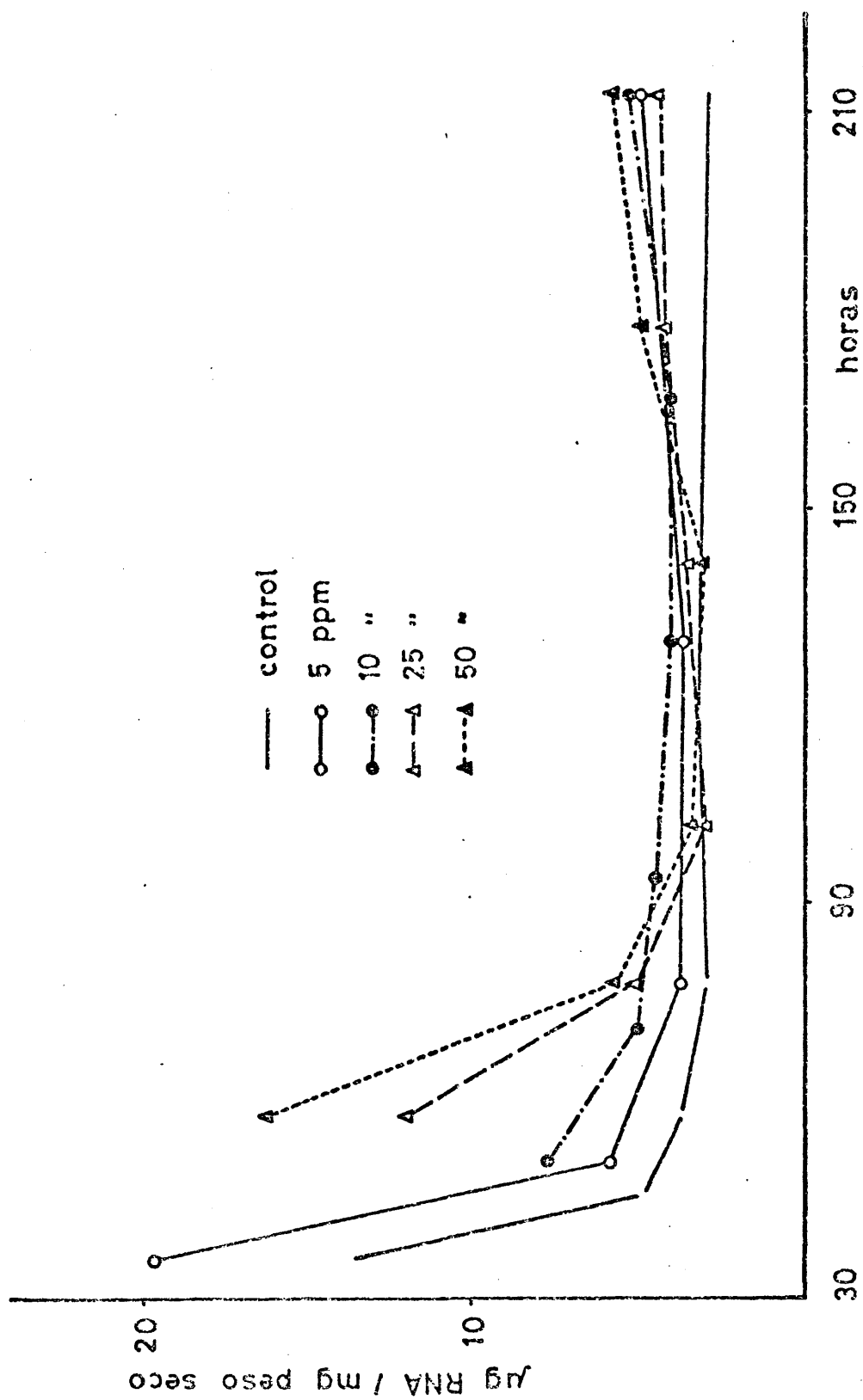


Fig. 19 -- Efectos de distintas concentraciones de A-1254 sobre los niveles relativos de RNA en micelio de A. flavus.

hasta una situación mucho más moderada ya hacia las 80 - 90 horas, aunque tampoco aquí llegan a igualarse estrictamente los cultivos controles y los tratados.

Por lo que respecta a los niveles relativos de DNA y proteínas, no fué posible apreciar diferencias significativas entre unos y otros cultivos.

Estimándose, a la vista de los anteriores resultados, que después de un periodo de incubación próximo a las 60 -- horas, la totalidad de los cultivos desarrollados en las -- condiciones expuestas deben encontrarse en una fase comparable de crecimiento, y por tanto también en estados fisiológicos comparables, se procedió a representar, frente al logaritmo de las dosis aplicadas y para un periodo de 60 horas de exposición, las variaciones en el peso seco y los niveles relativos de RNA como porcentajes de inhibición (I) y estimulación (E) respectivamente a partir de los valores obtenidos para los controles. No tratándose de cuantificar, como más atrás se comentó, una mortalidad, no pareció oportuno transformar los porcentajes de respuesta en probitas.

Dicho tratamiento, reflejado esquemáticamente en la fig. 20, pone de manifiesto, por lo que se refiere al peso seco, una correlación lineal log dosis - respuesta traducible, con una significación superior al 99%, a la ecuación:

$$I = 68,1 \log D - 18,9 \quad (1)$$

Por lo que se refiere a la respuesta del RNA, aunque

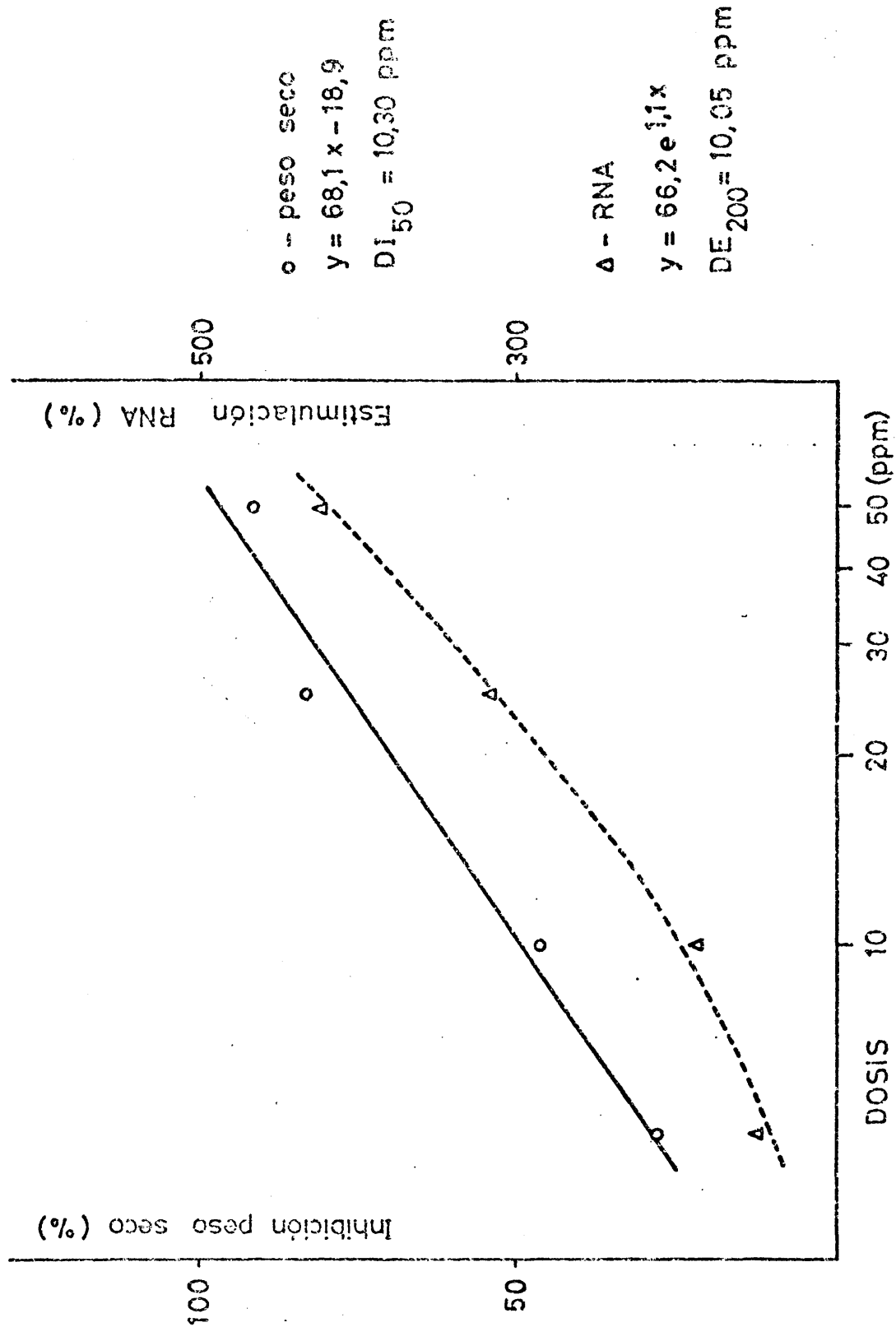


Fig. 20 - Relaciones dosis - respuesta en cultivos de A. flavus tratados con Aroclor-1254. (o): depresión del peso seco. (Δ): estimulación de la biosíntesis de RNA. Tiempo de exposición: 60 horas.

el ajuste a una ecuación análoga a la anterior resultaría aceptable, el grado de significación es muy superior ----- ($>99,9\%$) cuando el proceso se define a través de la ecuación exponencial:

$$E = 66,2 e^{1,1 \log D} \quad (2)$$

Más clara todavía (fig. 21) queda la correlación, asimismo exponencial y definida (coeficiente de correlación = $0,993$; significación, para 4 grados de libertad $>99,9\%$) por la ecuación:

$$N_{RNA} = 14,3 e^{-0,006 P} \quad (3)$$

entre pesos secos de micelio (P) y niveles relativos de RNA (N_{RNA}) para las distintas dosis de Aroclor-1254 ensayadas.

Cabe destacar finalmente que, como puede apreciarse en la fig. 20, la DI_{50} (dosis que deprime a la mitad del control los valores de peso seco) y la DE_{200} (dosis que estimula al doble del control la biosíntesis de RNA), son prácticamente coincidentes. Calculadas a partir de las ecuaciones (1) y (2) resultan ser $10,30$ y $10,05$ ppm respectivamente.

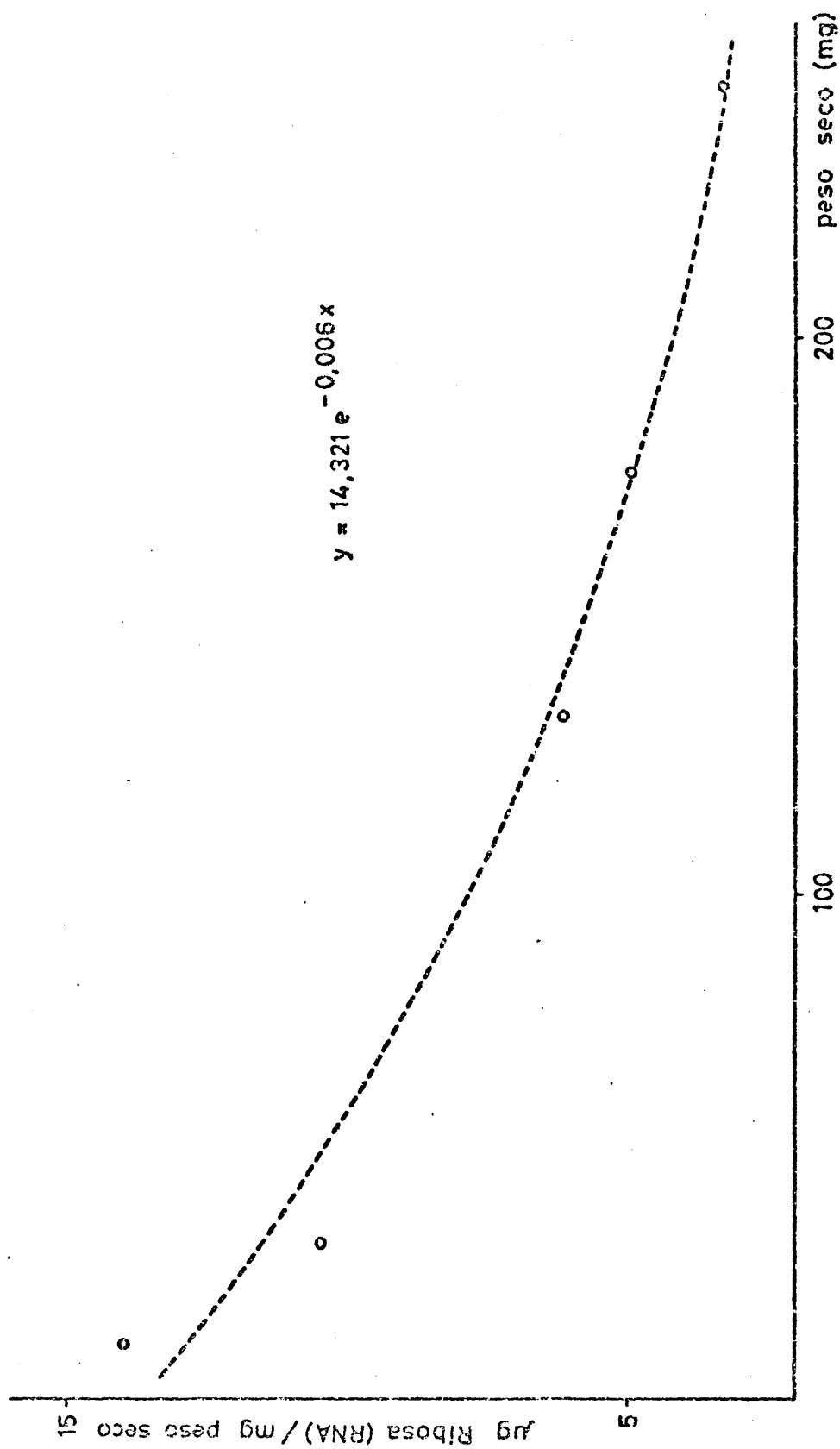


Fig. 21 - Correlación exponencial entre peso seco del micelio y niveles relativos de RNA en A. flavus desarrollados frente a diferentes dosis de Aroclor-- 1254. Tiempo de exposición: 60 horas.

3.2 - INFLUENCIA DEL GRADO MEDIO DE CLORACION SOBRE LA TOXICIDAD DE LOS PCBs FRENTE A Aspergillus flavus.

Como, según pusieron de manifiesto los resultados obtenidos en el caso del Aroclor-1254, es durante las fases -- precoces del desarrollo de los cultivos cuando los efectos tóxicos del xenobiótico aparecen más patentes, en los ensayos comparativos de toxicidad descritos a continuación, y -- a fin de disponer de cantidades suficientes de material biológico en dichas fases tempranas, se utilizaron inóculos en los que el número de esporas por ml se encontraba aproximadamente duplicado con respecto al de las pruebas anteriores.

Asimismo, y con objeto de agudizar las posibles diferencias en los efectos tóxicos, todos los cultivos se dosificaron con 25 ppm de los distintos Aroclor, concentración que, como acaba de mostrarse, representa $\sim 2,5$ veces la -- DI_{50} del Aroclor-1254.

Según se aprecia en la fig. 22, que recoge la evolución del peso seco de las cosechas (valores medios de tres series de cultivos en las anteriores condiciones), todos -- los Aroclor ensayados ejercen efectos tóxicos claramente -- perceptibles, destacándose que la intensidad de tales efectos guarda una correlación inversa con el porcentaje medio de cloración de la mezcla de PCBs adicionada al medio.

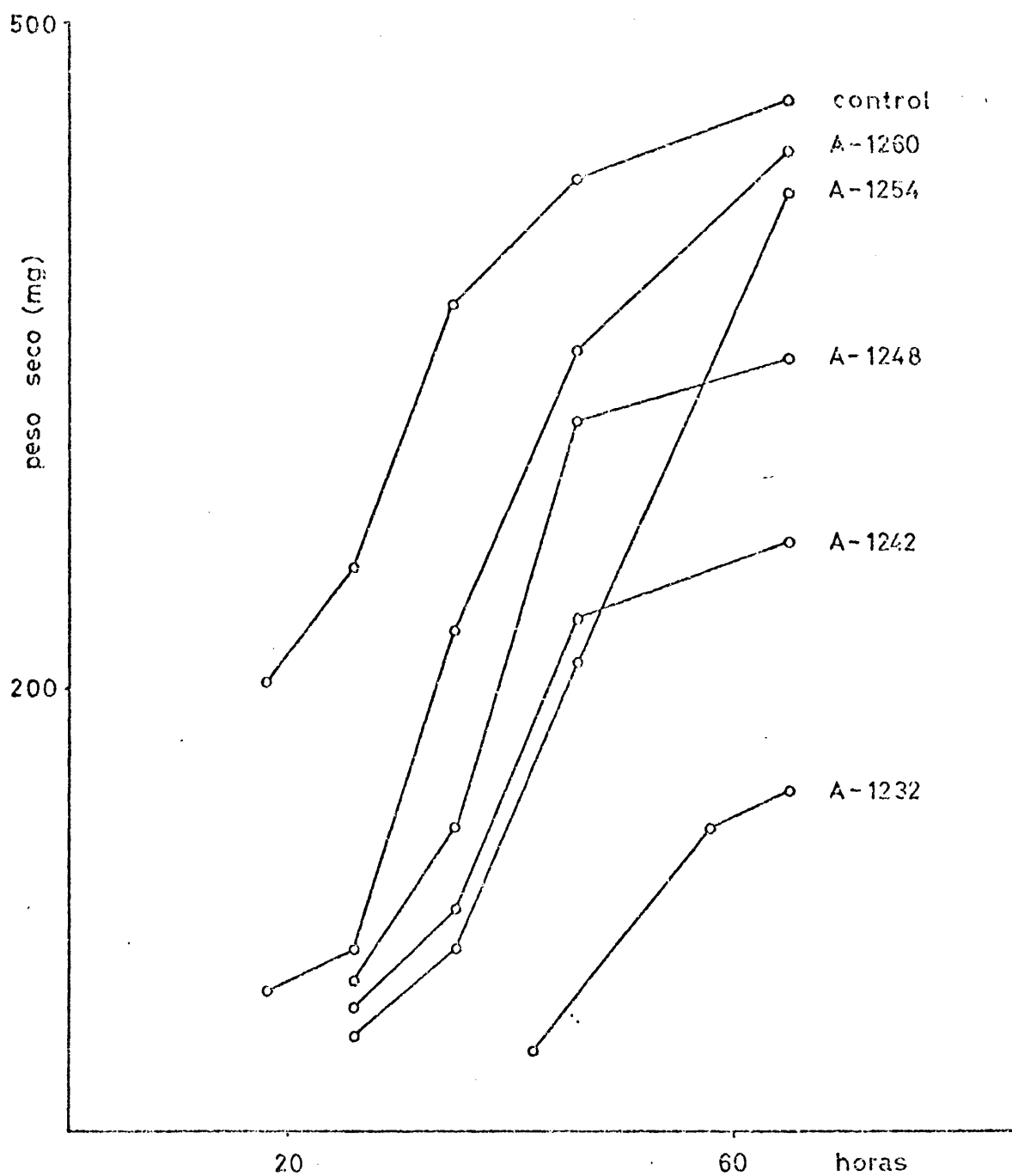


Fig. 22 - Desarrollo de Aspergillus flavus en presencia de 25 ppm de diferentes Aroclor.

Cabe asimismo destacar que, frente al perfil convencional de la curva correspondiente a los controles, el desarrollo de los cultivos tratados con PCBs resulta más irregular, con fases de latencia que se prolongan durante periodos --- anormalmente dilatados.

La tabla VII, en donde, junto con los pesos secos, se recogen datos comparativos sobre los niveles relativos de RNA a dos diferentes periodos de exposición, es coherente -- a la luz de los resultados expuestos en el capítulo precedente -- con la anterior apreciación. Efectivamente, la inhibición del crecimiento y la estimulación correlativa de la biosíntesis de RNA alcanzan sus valores máximos en el caso del Aroclor-1232 y descienden a medida que se eleva el porcentaje de cloración, con una discontinuidad en el caso del Aroclor-1254, el cual, por cualquiera de los dos criterios, exhibe una toxicidad superior a la que parecería corresponderle por su contenido en cloro.

(Cabe subrayar que, durante el transcurso del presente trabajo, varias notas técnicas de la entidad manufacturadora, señalaron la presencia de trazas de policlorodibenzodioxinas -- impurezas de elevada incidencia tóxica -- específicamente en el Aroclor-1254, lo cual explica satisfactoriamente la desviación observada, a la par que sugiere la elevada sensibilidad de la metodología de bioensayo).

Por último, es de mencionar el hecho de que, aun cuando los efectos tóxicos de todos los Aroclor todavía persisten después de 150 horas de incubación, resultan muy suavi-

Tabla VII - Efectos de diferentes Aroclor (25 ppm) sobre peso seco y el contenido relativo de RNA, en cultivos de Aspergillus flavus a diferentes tiempos de incubación.

	P. seco (mg)		P. seco (%)		µg Ribosa / p. seco (RNA)	
	75 h.	150 h.	75 h.	150 h.	75 h.	150 h.
CONT.	289,0	612,1	100	100	5,9	3,4
A-1232	4,0	327,3	1,4	53,4	18,6	4,3
A-1242	9,9	492,3	3,4	80,4	18,5	3,2
A-1248	11,3	458,2	3,9	74,8	13,2	4,1
A-1254	9,7	301,4	3,3	49,2	18,0	4,0
A-1260	158,6	594,1	54,6	97,0	6,2	4,6

zados en relación con los que se manifestaban a las 75 horas.

Una vez sobrepasada la fase de crecimiento exponencial, e iniciado en los cultivos el periodo de autólisis, durante el cual los procesos autometabólicos llegan a reducir, después de unas 800 horas, el peso seco de la cosecha a un valor que oscila alrededor del 50 % de la cosecha máxima, la presencia de PCBs continúa afectando la dinámica del microorganismo.

Si bien los efectos no son aquí tan claros como en las fases anteriores y las diferencias entre los cultivos desarrollados en presencia de los distintos Aroclor tienden a desaparecer — al menos por lo que se refiere al peso seco — con el transcurso del tiempo, de un modo general es posible afirmar que son los PCBs con un menor porcentaje de cloración los que, después de haber ejercido un mayor efecto inhibitorio durante la fase exponencial, determinan ahora un retardo más significativo en los procesos endometabólicos (fig. 23).

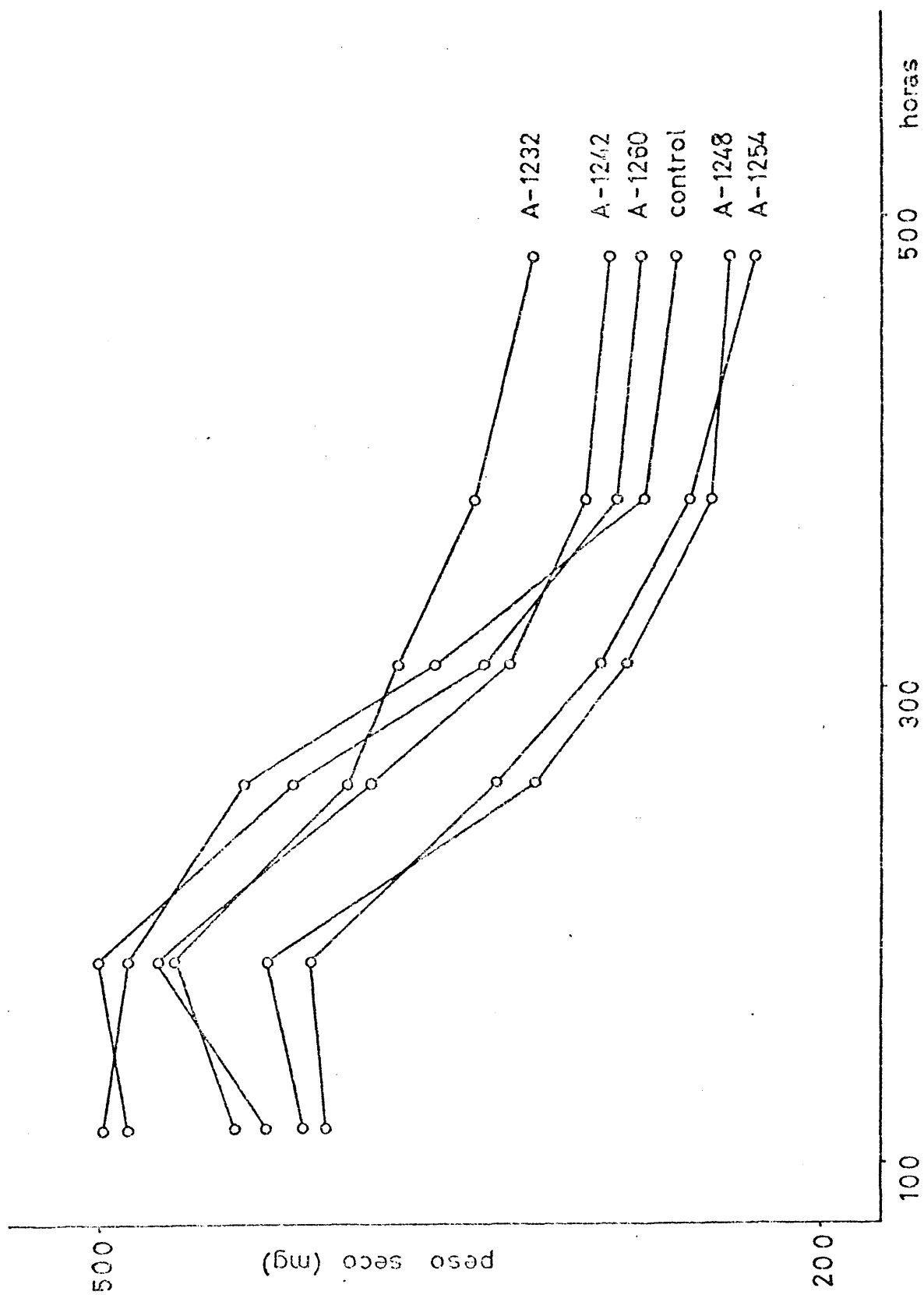


Fig. 23 - Desarrollo de *A. flavus*, en presencia de 25 ppm de diferentes Aroclor, durante las fases estacionaria y deficitaria de nutrientes.

3.3 - LA RESPUESTA DE Saccharomyces cerevisiae A LOS PCBs.

Todos los resultados obtenidos a este respecto parecen indicar que dicha respuesta constituye un caso de mayor complejidad que el representado por Aspergillus flavus.

Considerando primeramente el desarrollo — en términos de peso seco — del microorganismo en presencia de 25 ppm de los distintos Aroclor (fig. 24 y 25), destaca el hecho de — que la respuesta al xenobiótico viene en gran medida condicionada por la naturaleza de la fuente orgánica de carbono disponible en el medio de cultivo.

Efectivamente, en medios con fuentes de carbono fermentables (glucosa-1%), que promueven un rápido desarrollo — del Saccharomyces, la situación, al menos en las fases precoces de los cultivos, aparece cualitativamente semejante a la ya descrita para A. flavus : aunque desde un punto de vista cuantitativo la inhibición del crecimiento resulta mucho menos acusada que en aquel caso, todos los Aroclor ejercen efectos inhibitorios, haciéndolo en tanto mayor grado cuanto menor es su porcentaje medio de cloración.

Por el contrario, en medios con fuentes de carbono no fermentables (etanol-3%), que si bien no permiten un crecimiento tan rápido acaban por proporcionar cosechas máximas más elevadas, únicamente los Aroclor 1232 y 1242 provo-

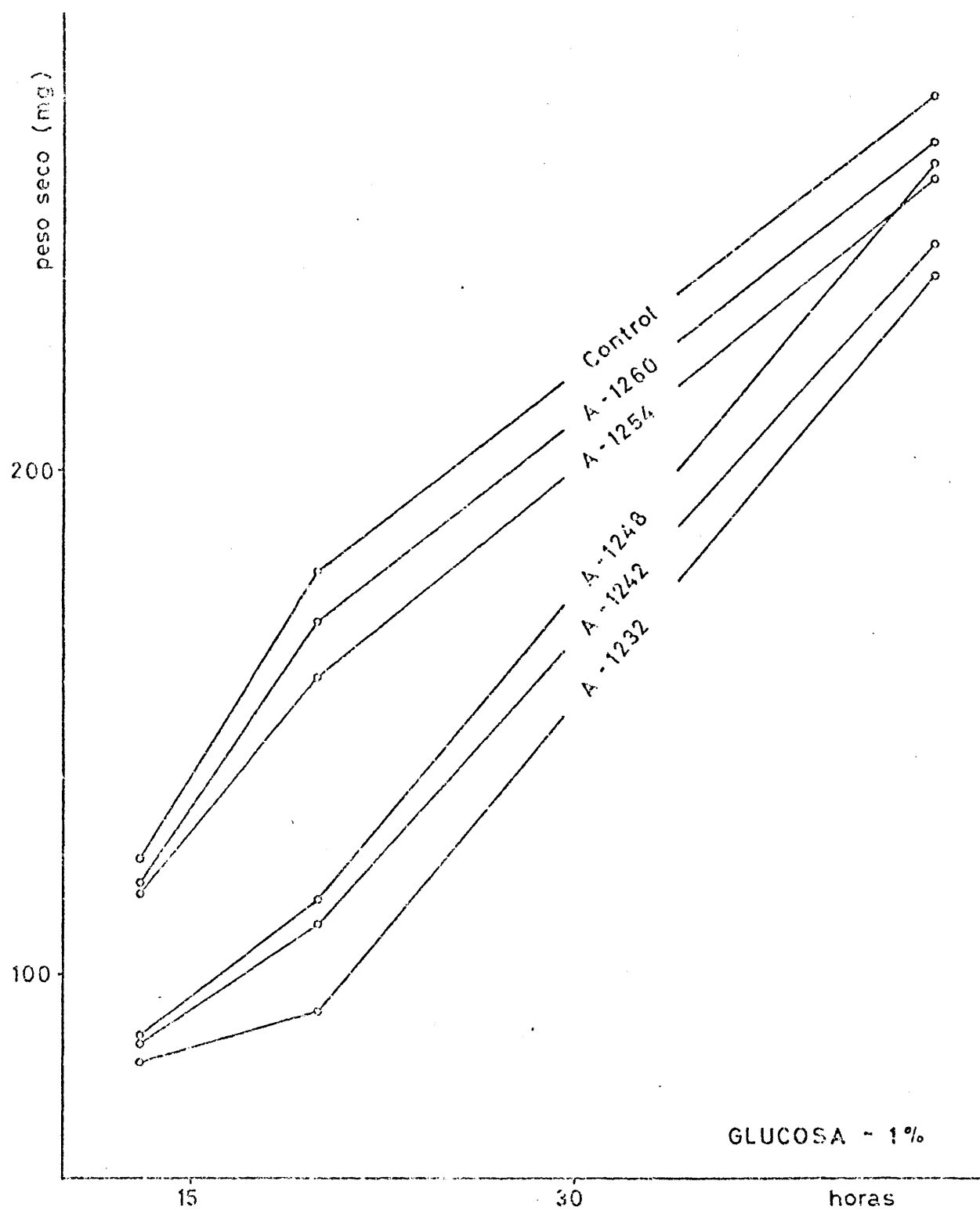


Fig. 24 - Desarrollo de Saccharomyces cerevisiae en presencia de 25 ppm de diferentes Aroclor. (Fuente de carbono: glucosa).

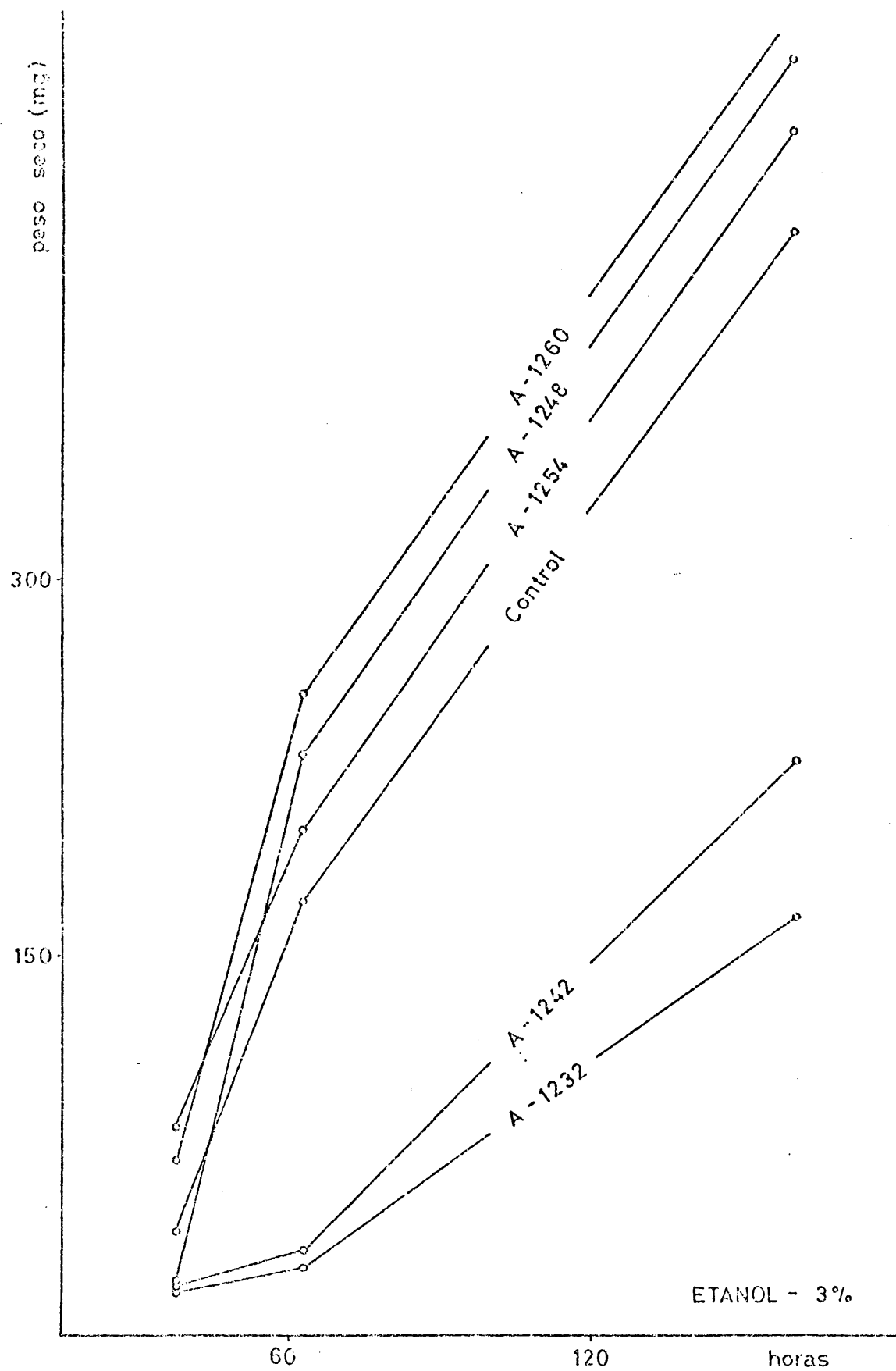


Fig. 25 - Desarrollo de *S. cerevisiae* en presencia de 25 ppm de diferentes Aroclor. (Fuente de C: etanol).

con la aparición de fases de latencia dilatadas, ejerciendo un efecto depresor -- en fases muy precoces también el 1248 -- que, en el caso del primero, resulta incluso cuantitativamente comparable al que producía sobre el A. flavus.

Los Aroclor 1254, 1260 y, después de un breve periodo de expansión, el 1248, causan un efecto estimulador no -- excesivamente acusado, pero significativo, y que, como prueba la recuperación del producto intransformado al finalizar el periodo de incubación, en absoluto puede atribuirse a -- su utilización directa, por parte del microorganismo, como fuente de carbono o energía.

Por lo que se refiere a los niveles relativos de RNA (tabla VIII), los resultados aparecen mucho más oscuros que los comentados en los apartados precedentes. De hecho, únicamente después de un breve periodo de exposición (alrededor de 20 horas para los cultivos desarrollados en medios fermentables y 60 horas en medios no fermentables) parece darse una estimulación en la biosíntesis de dicho componente frente a los PCBs de baja cloración, en medio glucosado.

De menor significación son las elevaciones que, en medio no fermentable, parecen provocar los PCBs de mayor contenido medio en cloro, contrariamente a lo que cabría esperar, especialmente el Aroclor-1254 (caso que quizá pudiera atribuirse a las policlorobenzodioxinas, antes citadas, que impurifican esta mezcla en particular).

Como en el caso del A. flavus, no se detectaron dife-

Tabla VIII - Niveles relativos de RNA en cultivos de Saccharomyces cerevisiae, desarrollados en presencia de 25 ppm de distintos alcoholes.

	GLUCOSA - 1 %		ETANOL - 3 %	
	20 h.	44 h.	60 h.	160 h.
CONTROL	20,27	27,28	16,40	21,97
A-1232	29,74	24,46	16,30	23,10
A-1242	33,39	26,43	18,05	22,63
A-1248	22,89	28,15	17,30	24,20
A-1254	25,92	22,32	22,10	21,80
A-1260	26,78	28,13	20,10	24,90

Los valores numéricos en tabla corresponden a μg Ribosa (RNA) / p. seco.

rencias significativas en los niveles relativos de DNA y - proteínas en cultivos controles y tratados.

Efectuada la aproximación dosis - respuesta - y basándose en este caso la cuantificación del crecimiento en la medida de la absorbancia a 660 nm de una muestra de cada cultivo frente a un blanco de medio fresco - se encontró que - si las comparaciones se llevan a cabo, como es lo usual, en fase exponencial precoz (alrededor de las 20 y 40 horas respectivamente para medios fermentables y no fermentables), - únicamente parecen poseer verdadera consistencia los resultados referentes a la actividad del Aroclor - 1232, cuyas relaciones dosis - respuesta (fig. 26) responden, con una significación superior al 99%, a las ecuaciones:

$$I = 43,02 \log D - 21,98 \quad (\text{glucosa} - 1\%)$$

$$I = 80,85 \log D - 38,06 \quad (\text{etanol} - 3\%)$$

que proporcionan, para la DI_{50} , valores de 46,7 y 12,3 ppm respectivamente.

En el resto de los Aroclor en situaciones inhibitorias, los valores de la DI_{50} quedan muy por encima del límite superior del intervalo de concentraciones utilizado, por lo - que, pese al aceptable ajuste de las correspondientes regresiones lineales, cabe dudar de la significación de unas extrapolaciones que, en el caso más moderado, situarían a la DI_{50} en dos órdenes de magnitud por encima de las anteriores (8 700 y 4 980 ppm en medio fermentable y no fermentable,

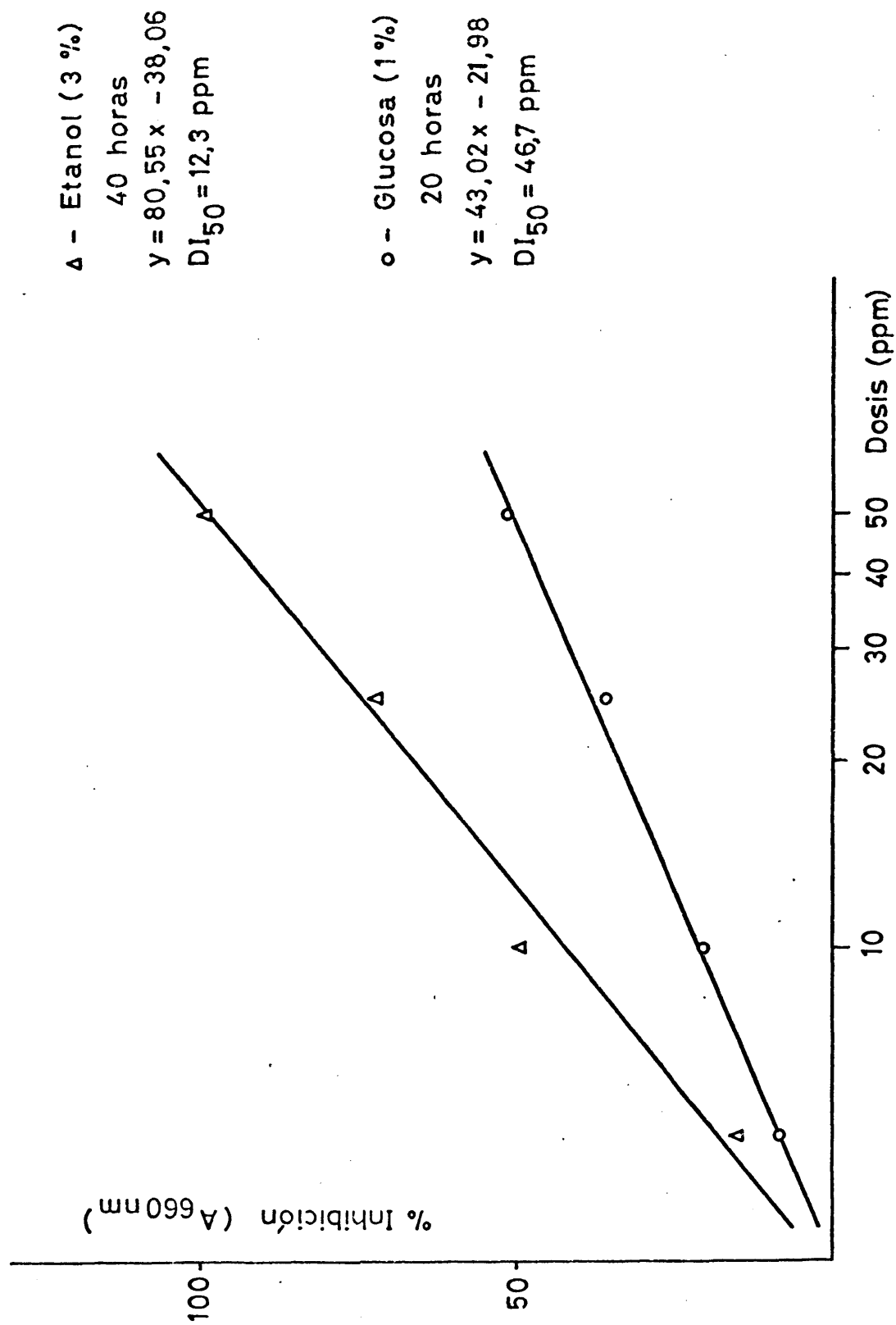


Fig. 26 - Relaciones dosis - respuesta en cultivos de Saccharomyces cerevisiae tratados con Aroclor-1232.

respectivamente, frente al Aroclor - 1242).

Efectivamente, además del dudoso sentido de una comparación toxicológica a través de una tal desproporción de -- efecto -- y que hace sospechar que las actividades biológicas que subyacen a ambos casos tampoco sean estrictamente -- comparables --, cabría añadir que incluso la adición a medios acuosos de concentraciones ligeramente superiores a -- las 50 ppm, particularmente en los PCBs de alto contenido -- en cloro, resulta muy dificultosa e imperfecta, aun utilizando un disolvente orgánico miscible con agua como portador, por razones de solubilidad.

----- . -----

Una recapitulación de los resultados recogidos en los últimos apartados permite formular ciertas conclusiones provisionales con valor de hipótesis de trabajo :

1) En la toxicidad de los PCBs frente a Aspergillus flavus podrían desempeñar un papel relevante -- a juzgar por la correlación existente entre intensidad del efecto tóxico y estimulación de la biosíntesis de RNA -- mecanismos de inducción enzimática susceptibles de ser desencadenados por -- la presencia del xenobiótico.

2) La respuesta de Saccharomyces cerevisiae a la presencia de PCBs parece descansar en bases fisiológicas de -- distinta naturaleza, con respecto a las cuales cabe subrayar :

a) Las relaciones estructura química - actividad biológica resultan aparentemente mucho más estrictas que -- las que gobiernan la respuesta de A. flavus, ya que las diferencias entre los efectos producidos por PCBs de distinto grado de cloración son mucho más notables que en aquel caso.

b) La mayor intensidad de efecto - claramente --- constatable al menos en el caso de la mezcla de mayor incidencia (Aroclor-1232) - que se registra cuando el microorganismo se desarrolla en medios no fermentables, es decir, cuando se ve obligado a cubrir todas sus necesidades energéticas por vía oxidativa (respiratoria), sugiere el ciclo de Krebs como blanco de la acción tóxica. Cuando el microorganismo, por el contrario, puede obtener un aporte energético significativo - la cepa utilizada posee un poder fermentativo medio - por vía fermentativa, escapa en cierto grado a la acción del xenobiótico.

c) De la conjunción de los puntos a) y b) podría desprenderse que entre los Arocloros de bajo grado de cloración existen estructuras susceptibles de inhibir una o varias enzimas implicadas en el ciclo de Krebs.

4 - LOS PCBs COMO POSIBLES INDUCTORES ENZIMATICOS INJUSTIFICADOS.

Los resultados que figuran en el apartado anterior en torno a los niveles relativos de RNA encontrados en cultivos sometidos a distintas concentraciones de Aroclor-1254 y concentraciones equivalentes de distintos Aroclor, sugieren con fuerza, a la luz de las observaciones registradas - por otros autores en situaciones comparables, en otras entidades biológicas, la posibilidad de que los PCBs estimulen, en Aspergillus flavus, la síntesis de algún sistema enzimático catabolizante.

Efectivamente, la elevación del contenido relativo de RNA parece constituir una característica de la respuesta de diversos sistemas biológicos a numerosos compuestos exógenos - una larga serie de fármacos, por ejemplo - y aunque - en relación con microorganismos existe todavía muy escasa - documentación a este respecto, el hecho ha sido repetidamente constatado en estudios llevados a cabo con organismos superiores - muy especialmente en hígado de mamíferos, órgano sobre el que clásicamente se centran tales estudios -.

Es importante, por otra parte, destacar el hecho de -- que la ausencia de transformaciones que incidan sobre los xenobióticos ensayados - tal como quedó de manifiesto en anteriores capítulos - parece oponerse a la hipótesis de la capacidad de inducción enzimática de los PCBs en este caso

particular. Existe, sin embargo, una explicación plausible, y podría consistir en que, aun actuando tales compuestos como inductores de algún sistema enzimático catabolizante, no constituyesen ulteriormente un sustrato susceptible al ataque de aquél.

Cabe subrayar que, aun no habiendo sido descrito en relación con la problemática de los compuestos xenobióticos - un tal proceso de "inducción injustificada" de enzimas, dicho mecanismo se encuentra lejos de constituir un fenómeno desconocido, e inductores injustificados o gratuitos de la β -galactosidasa en Escherichia coli - como el tiometilgalactósido y el isopropiltiogalactósido - desempeñaron un -- importante papel metodológico precisamente en los estudios, hoy ya clásicos, llevados a cabo por el grupo de Monod en torno a la regulación de la función génica (ver, por ejemplo, Monod et al., 1952).

Es evidente que, de encontrarse los PCBs en este caso, podrían provocar un considerable trastorno en la economía - energética del microorganismo estudiado. Incluso suponiendo que el sistema enzimático inducido no actuase sobre algún - componente fúngico endógeno, desequilibrando algún balance metabólico más o menos esencial, es preciso tener en cuenta que la señal inductora, es decir, la presencia de los PCBs, al resistir el ataque del sistema inducido, obligaría a la célula a desviar de un modo sostenido una fracción de su - disponibilidad energética hacia la síntesis de uno o más - componentes complejos de utilidad nula.

Aun en la ausencia de cualquier otro mecanismo tóxico,

el anterior efecto podría alcanzar una notable relevancia y justificar por si solo las variaciones encontradas en la -- biomasa de los cultivos desarrollados en las condiciones -- más atrás especificadas. Debe observarse, por otra parte (véanse los datos correspondientes en el capítulo anterior) que, tanto para las distintas concentraciones de Aroclor -1254 ensayadas, como para los efectos provocados por concentraciones iguales de Aroclor de diferente toxicidad, --- existe una clara correspondencia entre elevación de los niveles de RNA y depresión de los valores de peso seco, relaciones que resultan coherentes con el anterior supuesto.

4.1 - METABOLISMO "ALOINDUCIDO" DE OTROS XENOBIOTICOS "IN VIVO".

En la hipótesis de que los PCBs desarrollan una actividad inductora de un sistema enzimático que, si bien parece resultar inefectivo frente a aquellas moléculas, debe responder, desde el punto de vista de su significado biológico formal, a una función detoxificante, cabe asimismo suponer — y su inefectividad "de facto" ante los PCBs así lo sugiere — que tal proceso inductivo constituye una respuesta --- inespecífica, estereotipada, de la entidad biológica que la desarrolla a la presencia de un tipo no excesivamente particularizado de molécula inductora.

La investigación de esta nueva hipótesis de trabajo se llevó a cabo cuantificando las transformaciones experimentadas por otros xenobióticos — aldrín, DDT, pentobarbital y anilina, según los procesos esquematizados en un capítulo — precedente — en cultivos de Aspergillus flavus desarrollados en condiciones "control", frente a otros a los que se adiciona una concentración inicial de 25 ppm de diferentes Aroclor.

Los correspondientes resultados se recogen en las tablas IX y X, donde, efectivamente, se pone de manifiesto — que, al menos en los casos del aldrín, DDT y pentobarbital, la presencia de los PCBs intensifica su ritmo de transformación por parte del microorganismo.

TABLA IX - Metabolismo de aldrín y DDT (adicionados por separado) en cultivos de Aspergillus flavus desarrollados en presencia de 25 ppm de diferentes Aroclor.

	Aldrín (ppm) ^a	PCB (ppm) ^b	A _t (μg) ^c / Mic. (mg) ^d
CONTR.	5	—	0,306
A-1232	5	25	1,225
A-1242	5	25	0,928
A-1248	5	25	0,509
A-1254	5	25	0,901
A-1260	5	25	0,479

	DDT (ppm) ^a	PCB (ppm) ^b	DDT _t (μg) ^c / Mic. (mg) ^d
CONTR.	7	—	0,071
A-1232	7	25	0,542

a: aldrín - o DDT - añadido; b: PCB añadido; c: aldrín - o DDT - transformado al final del periodo de incubación; d: peso seco del micelio; a y b: concentraciones en el medio de cultivo.

TABLA X -- Metabolismo de pentobarbital en cultivos de Aspergillus flavus desarrollados en presencia de 25 ppm de diferentes Aroclor.

	Pentob. (ppm) ^a	PCB (ppm) ^b	Pentobarbital transformado (μ g) / / Peso seco micelio (mg)	
			\bar{x} ^c	\bar{d} ^t
CONTR.	45	--	5,47	5,20
A-1232	45	25	55,03	28,46
A-1242	45	25	8,92	7,39
A-1248	45	25	7,45	5,82
A-1254	45	25	7,78	6,80
A-1260	45	25	6,47	6,31

a: pentobarbital añadido; b: PCB añadido; c: pentobarbital transformado después de un periodo de incubación completo (62 horas); d: idem, cuando (a) se añade 46 horas después de iniciada la incubación; a y b: concentraciones en el medio de cultivo.

Debe destacarse, por otra parte, que, como puede apreciarse en los ensayos llevados a cabo con toda la gama de Aroclor (véanse resultados correspondientes al aldrín y a las dos situaciones examinadas en el pentobarbital), los efectos del porcentaje de cloración en los PCBs sobre dicha intensificación resultan paralelos a los que se ejercen sobre los niveles relativos de RNA: la desviación con respecto al control es máxima en el caso del Aroclor-1232 y decrece a medida que aumenta el grado de cloración, exceptuándose la discontinuidad representada por el Aroclor-1254. Así, cuando se representan los niveles relativos de RNA --- frente al aldrín transformado por unidad de peso seco de micelio (fig. 27) la correlación lineal obtenida, con un coeficiente igual a 0,897, muestra -- para los 5 grados de libertad utilizados, y según las tablas de Fisher y Yates -- una significación superior al 99%.

Aunque en líneas generales los resultados obtenidos -- con el pentobarbital ponen de manifiesto un fenómeno de --- idéntica naturaleza, la correlación entre la intensificación de su metabolismo y la estimulación de la síntesis de RNA presenta una significación más baja. Sin embargo, ello es muy probablemente atribuible a la escasa idoneidad del método seguido para la extracción del pentobarbital, método que, según se comprobó en varios ensayos con soluciones estandar del barbitúrico, proporciona recuperabilidades bajas e incluso poco reproducibles.

Finalmente, en ninguno de los numerosos ensayos llevados a cabo con la anilina, y en los que se operó a diversas concentraciones y diferentes tiempos de incubación, fué po-

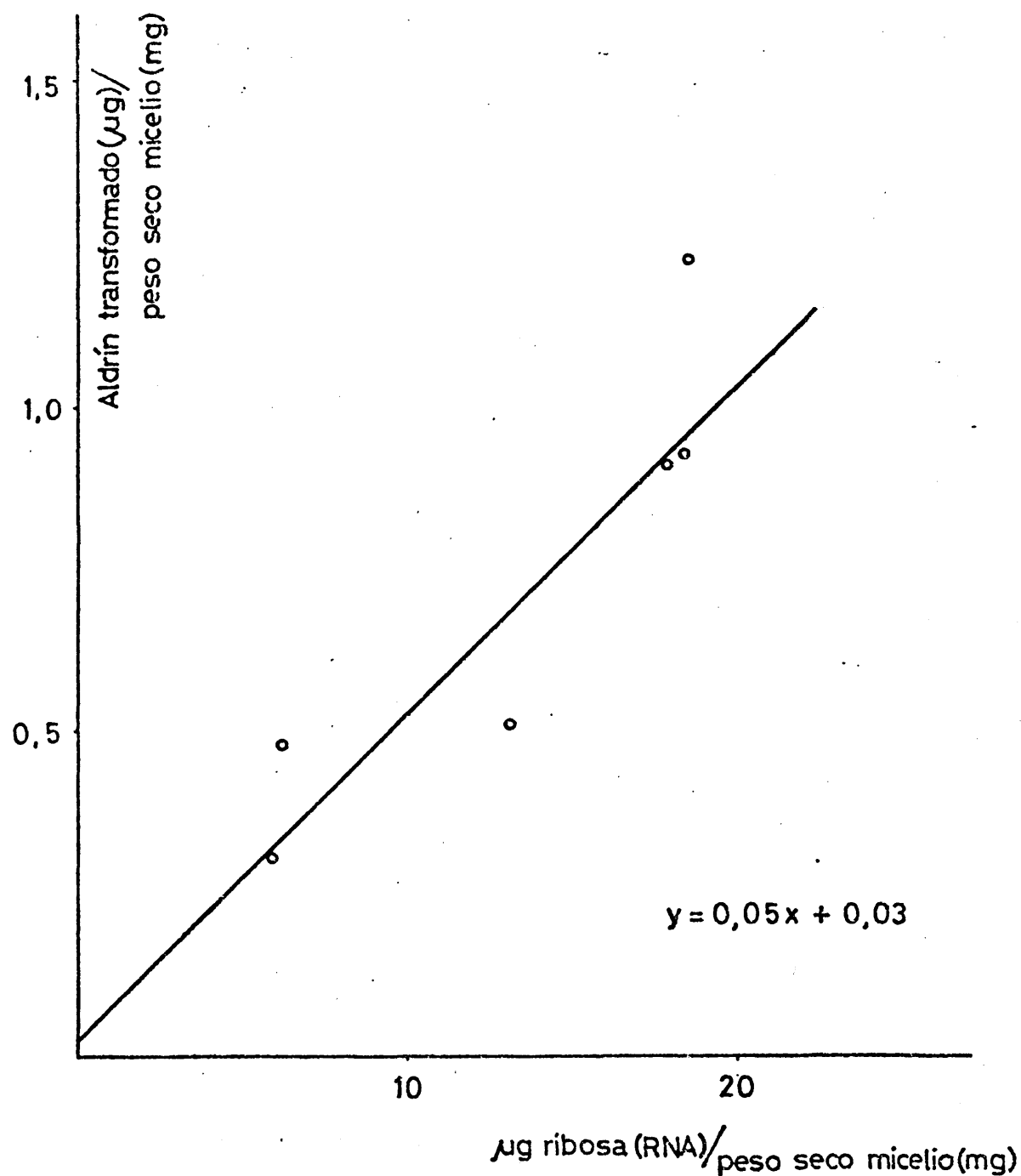


Fig. 27 - Correlación entre estimulación de la síntesis de RNA (inducida por PCBs) e intensificación del metabolismo del aldrín en cultivos de Aspergillus flavus. Coeficiente de correlación: 0,897.

sible la detección del p - aminofenol que cabría esperar, pese a la gran sensibilidad de la metodología utilizada. Aunque tal ausencia puede interpretarse como una carencia de actividad hidroxilante sobre el núcleo aromático por parte del microorganismo, podría asimismo suponerse que la anilina, en el Aspergillus flavus, sigue rutas metabólicas que no implican — o lo hagan únicamente de modo muy transitorio — al p - aminofenol.

En cualquier caso, la hipótesis planteada al principio de este apartado parece quedar probada de un modo suficiente con los resultados obtenidos frente al aldrín, DDT y pentobarbital. La calificación de "metabolismo ALOINDUCIDO" — que no hemos visto utilizada en la bibliografía con una significación conflictiva con la que aquí se propone — parece, en principio, adecuada para tipificar el fenómeno que se acaba de describir.

----- . -----

Aplicado sistemáticamente un análogo proceso experimental a cultivos de Saccharomyces cerevisiae, en ningún caso fué posible constatar interacciones del tipo de las encontradas en Aspergillus flavus, resultado que, por otra parte, ya cabía presuponer de ser correcta la interpretación dada en las páginas precedentes al fenómeno, a la vista de la nula incidencia de los PCBs sobre la biosíntesis del RNA en la levadura.

Con todo, cabe referirse al hecho de que, particular -

mente en el caso de los cultivos dosificados con aldrín, la comparación entre los controles - sin PCBs - desarrollados en medios fermentables y no fermentables, puso de manifiesto la mayor intensidad de los efectos inhibitorios del insecticida en estos últimos, lo cual sugiere una similaridad en el modo de acción de aldrín y PCBs sobre el Saccharomyces cerevisiae.

4.2 - ENSAYOS ENZIMATICOS "IN VITRO". AUSENCIA DE CITOCROMO P - 450.

Ninguno de los repetidos ensayos llevados a cabo con fracción microsomal de A. flavus frente a sustratos característicos de O.F.M., aportaron evidencias que corroborasen la inducción enzimática que manifiestan los resultados producidos "in vivo".

Puesto que la reducción del NADP (cofactor indispensable para la actividad microsomal) en la mezcla de incubación sí que se produce - comprobado por el incremento de la absorbancia a 340 nm - , esta inactividad "in vitro" podría deberse, entre otras causas, a efectos inhibitorios del ácido kójico (Mayer et al., 1946), quizá sometido en la célula intacta a algún bloqueo fisiológico u otro tipo de mecanismo de control.

Por otra parte, a pesar de que las valoraciones que se efectuaron, con fracción microsómica de hígado de rata, pusieron de manifiesto la idoneidad de la metodología analítica utilizada, no se apreciaron indicios de citocromo P - 450 en la fracción microsómica procedente de A. flavus.

5 - EFECTOS DE LOS PCBs SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO.

En la fig. 28 se recoge la evolución del consumo de -- oxígeno por esporas germinantes de Aspergillus flavus en -- presencia de 25 ppm de cada uno de los Aroclor ensayados -- (se representan valores acumulativos medios de cuatro experiencias en las que se homologan estrictamente el número de esporas/ml y la edad de los cultivos sobre medio sólido de donde se obtienen).

Según allí se pone de manifiesto, la presencia de los PCBs estimula significativamente el consumo de oxígeno, debiendo observarse que, si se ajustan (fig. 29) los valores experimentales obtenidos a una ecuación logística:

$$\frac{dR}{dt} = aR - bR^2$$

	<u>a</u>	<u>b</u>
CONTROL	0,446	$1,90 \cdot 10^{-3}$
A-1232	0,605	$2,53 \cdot 10^{-3}$
A-1242	0,558	$2,12 \cdot 10^{-3}$
A-1248	0,506	$1,87 \cdot 10^{-3}$
A-1254	0,511	$1,96 \cdot 10^{-3}$
A-1260	0,500	$2,01 \cdot 10^{-3}$

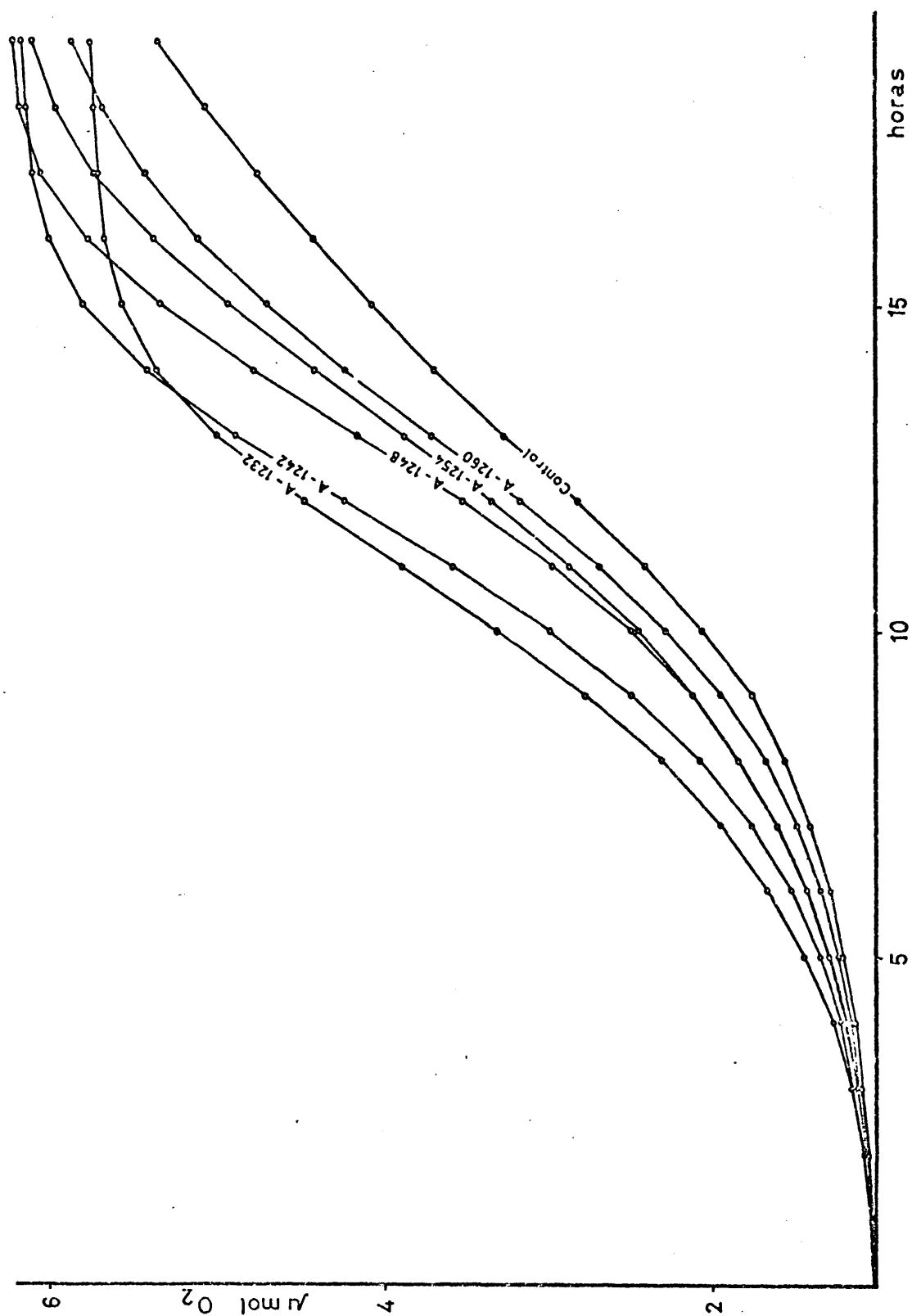


Fig. 28 - Evolución del consumo de O_2 en esporas germinantes de A. flavus dosificadas con 25 ppm de los distintos Aroclor. (23,2. 10⁶ esporas/ml; 2,5 ml en cada respirómetro).

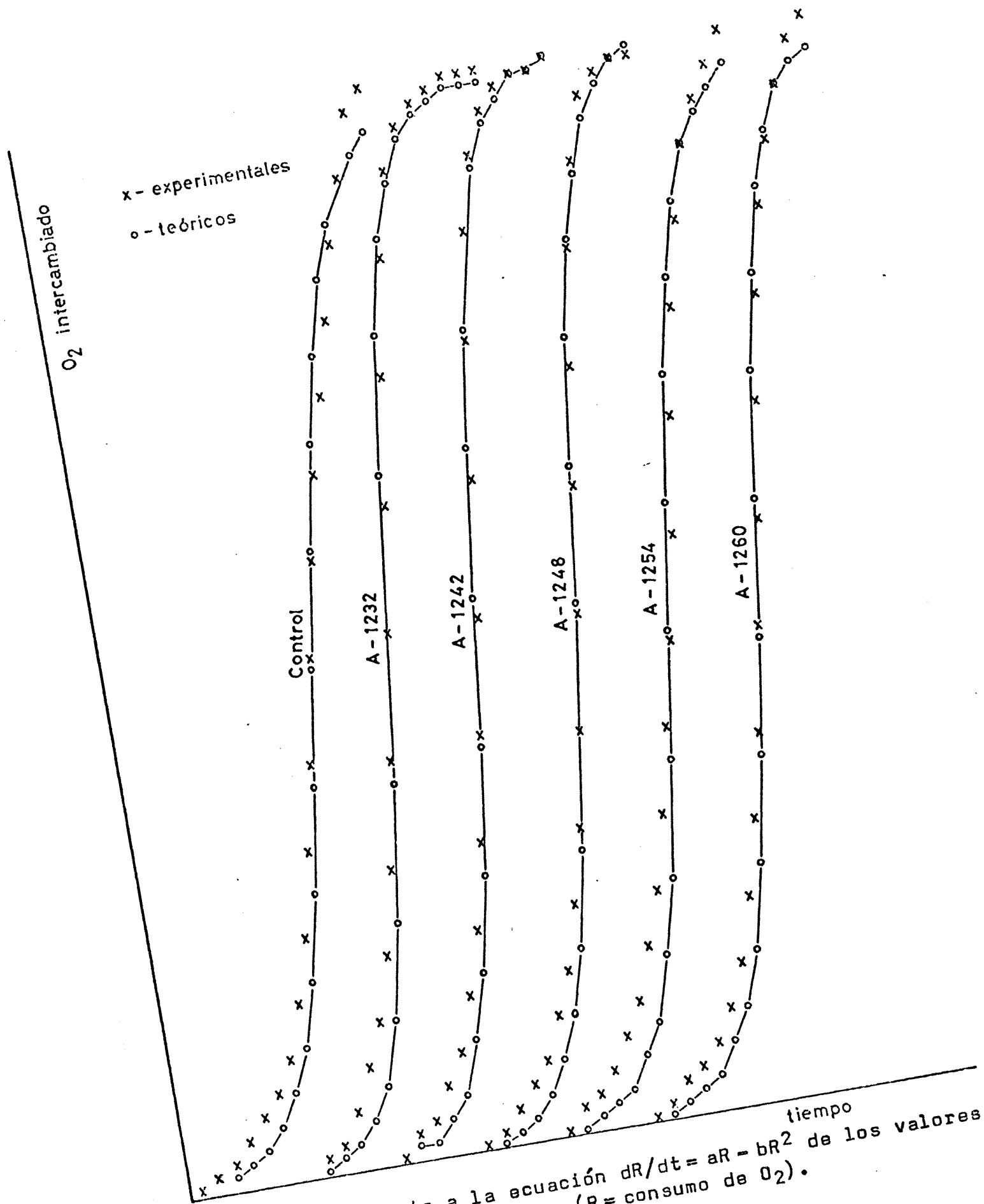


Fig. 29 - Ajuste a la ecuación $dR/dt = aR - bR^2$ de los valores experimentales de la fig. 28. (R = consumo de O_2).

los índices de consumo de oxígeno (a) descienden progresivamente -- aunque sin llegar nunca a los que se dan en los controles -- a medida que se eleva el porcentaje medio de cloración del xenobiótico, con la sola excepción del Aroclor - 1254 (desviación que concuerda con las observaciones constatadas en capítulos anteriores y cuya causa ya se explicó.

Si, a la luz de estos resultados, se considera el hecho de que la presencia de los PCBs deprime -- como quedó -- demostrado -- el desarrollo del microorganismo, parece inmediato concluir que el xenobiótico determina, en A. flavus, una caída de los rendimientos energéticos del metabolismo oxidativo, caída que, según todos los indicios, se debe a una canalización inadecuada de la energía liberada, más que a un bloqueo en los mecanismos que la producen.

Una situación en cierto modo inversa es la que ponen de manifiesto los datos relativos al Saccharomyces cerevisiae en medio no fermentable (fig. 30 y 31), ya que mientras la magnitud del efecto de los PCBs es máxima en el Aroclor - 1232 y decrece a medida que aumenta el porcentaje medio de cloración, la naturaleza de dicho efecto consiste en una depresión del consumo de oxígeno.

Por otra parte, la relación entre los coeficientes obtenidos por ajuste de los valores experimentales a la ecuación logística:

$$\frac{dR}{dt} = aR - bR^2$$

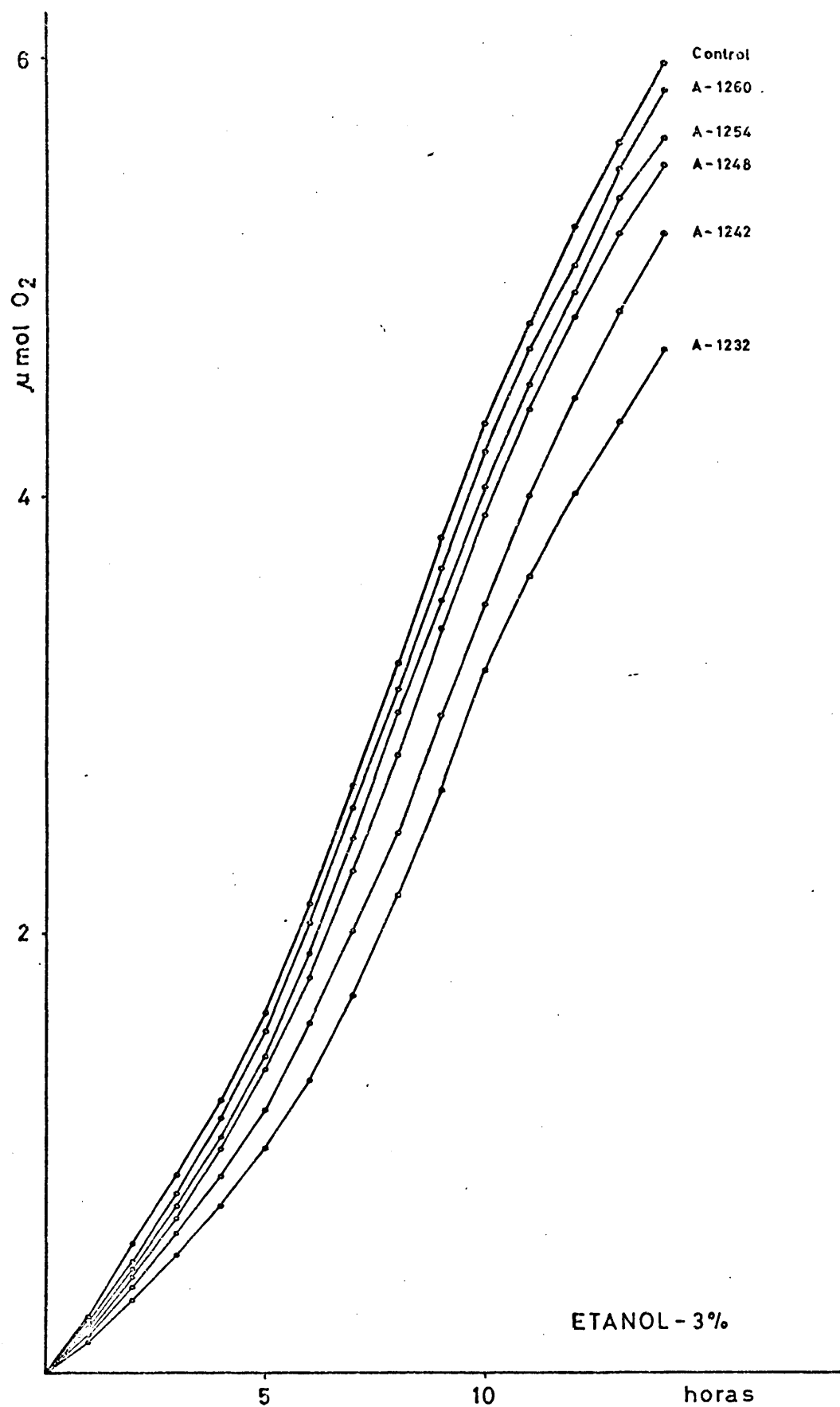


Fig. 30 - Evolución del consumo de O_2 en *S. cerevisiae* (medio no fermentable). $N_0 = 4,17 \cdot 10^6$ células/ml.

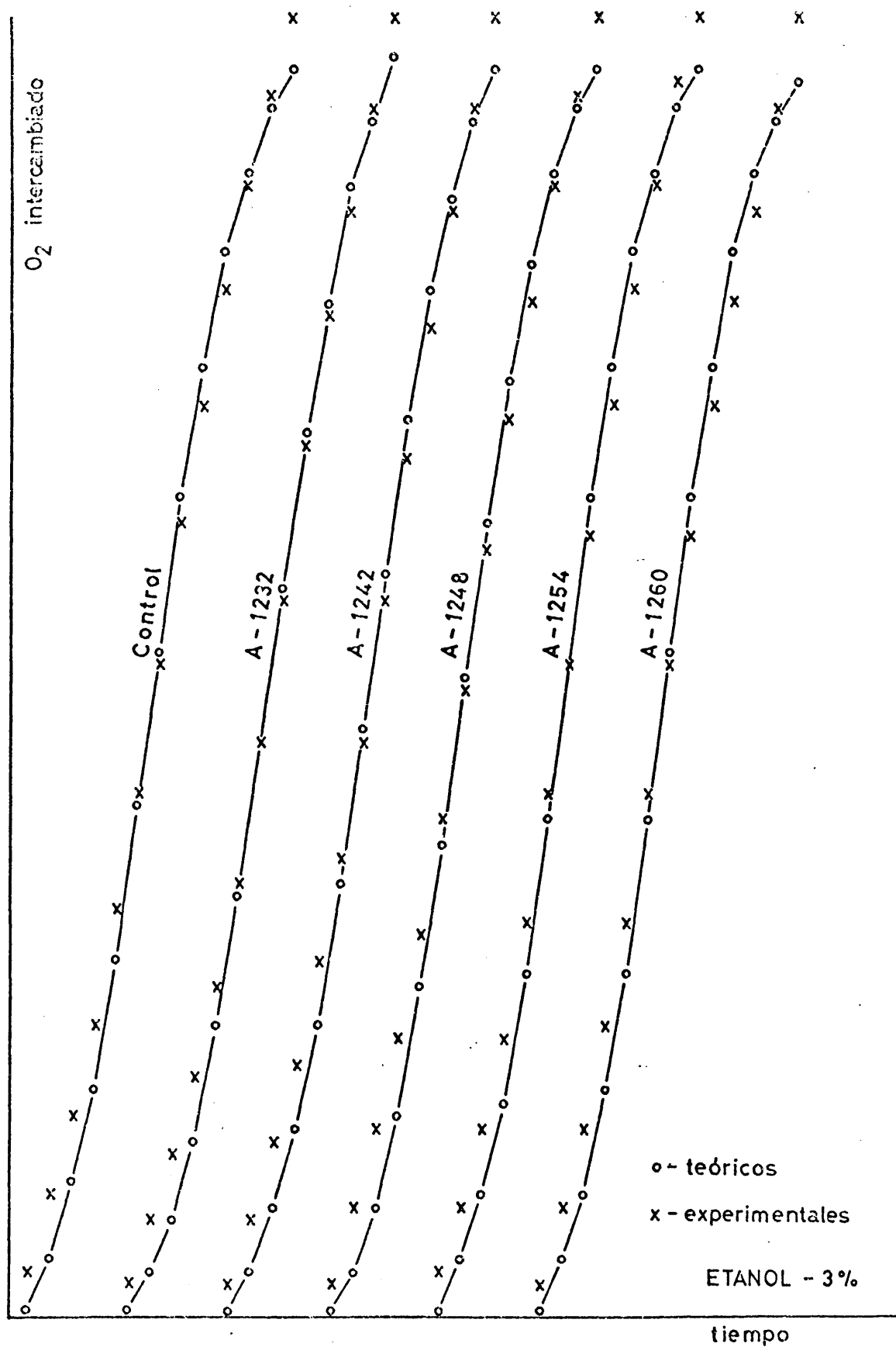


Fig. 31 - Ajuste a la ecuación $dR/dt = aR - bR^2$ de los valores experimentales de la fig. 30. (R = consumo de O_2).

	<u>a</u>	<u>b</u>
CONTROL	0,453	$2,99 \cdot 10^{-3}$
A-1232	0,457	$3,77 \cdot 10^{-3}$
A-1242	0,454	$3,36 \cdot 10^{-3}$
A-1248	0,477	$3,41 \cdot 10^{-3}$
A-1254	0,474	$3,32 \cdot 10^{-3}$
A-1260	0,472	$3,22 \cdot 10^{-3}$

muestra como la "capacidad de porte" — dada por el parámetro a/b —, toma valores que crecen con la intensidad de los efectos tóxicos.

De nuevo, pues, se patentiza la diferencia entre las respuesta de Aspergillus y Saccharomyces a los xenobióticos estudiados, al mismo tiempo que se refuerza la hipótesis de que, en esta última especie, los PCBs alteran de algún modo no los rendimientos — como en el caso anterior — del metabolismo oxidativo, sino la mecánica misma del proceso.

6 - EFECTOS DE LOS PCBs SOBRE EL TRANSPORTE ELECTRONICO EN Saccharomyces cerevisiae.

Las características de la inhibición en el consumo de oxígeno que, según pusieron de manifiesto las experiencias micromanométricas, provoca la presencia de los PCBs en cultivos de Saccharomyces cerevisiae, cuando el microorganismo se desarrolla en medios no fermentables, llevaron a plantear la hipótesis de que dichos xenobióticos pudieran desempeñar un papel mutagénico, elevando la tasa normal de producción de mutantes deficientes en algún componente esencial de la cadena respiratoria.

La aplicación, sin embargo, del ensayo del cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) según la técnica de Ogur et al. (1957), demostró que ninguno de los Aroclor exhibe una capacidad mutagénica significativa en tal sentido.

Con todo, es preciso señalar que existen mutantes con deficiencias en los mecanismos de transporte electrónico o funciones conexas, no susceptibles de detección mediante el ensayo del TTC, y así por ejemplo Parker y Matton (1969) advierten la existencia de mutantes incapaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa, pero capaces de reducir el TTC.

Las evidencias micromanométricas, no obstante, sugerían

con fuerza alguna disfunción en este tipo de mecanismos. De otro lado, en la bibliografía es posible hallar ciertos antecedentes, aunque no muy precisos, relativos a la actuación de determinados compuestos organoclorados, fundamentalmente insecticidas, como desacopladores del transporte electrónico o la fosforilación oxidativa en sistemas mitocondriales aislados de diversos órganos de mamíferos (Pardini et al., 1970 y 1971; Nelson y Williams, 1971; Sivalingan, 1973), lo cual apoya el anterior punto de vista.

En consecuencia, se procedió a la investigación de la influencia de los PCBs sobre la velocidad de reducción del TTC, utilizando ahora la técnica extractiva del formazán --descrita en un capítulo anterior, y operando sobre cultivos de *Saccharomyces* en medio sólido con fuente de carbono no fermentable (etanol - 3%), a fin de elevar la contribución de los mecanismos oxidativos al balance energético del microorganismo.

Los resultados, expuestos en la tabla XI, ponen de manifiesto una exaltación en la producción de formazán en los cultivos dosificados con los xenobióticos, con valores que descienden a medida que se eleva el porcentaje de cloración del Aroclor adicionado al medio.

Si bien en una primera apreciación ello parecería indicar que los PCBs determinan una intensificación del flujo de electrones a través de los portadores, una interpretación que integre estos resultados con los de los ensayos micromanométricos lleva forzosamente a otra explicación.

Tabla XI - Valoración de la actividad de transporte electrónico (A.T.E.) en cultivos de Saccharomyces cerevisiae sobre medio sólido, con fuente de C: etanol-3%, y en presencia de 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (~ 25 ppm) de los diferentes Aroclor.
(a): Valores de la fig. 30 (consumo acumulativo de O_2 después de 7 horas - en mitad del período de consumo máximo -).

	490 nm A 1 cm	Formazán ($\mu\text{mol}/\text{cultivo}$)	A.T.E. % control	(a): depresión del consumo O_2 (%)
CONTROL	0,085	0,213	100	—
A-1232	0,198	0,498	232	35,7
A-1242	0,174	0,437	204	24,6
A-1248	0,152	0,382	178	14,4
A-1254	0,125	0,314	147	8,8
A-1260	0,116	0,291	136	3,7

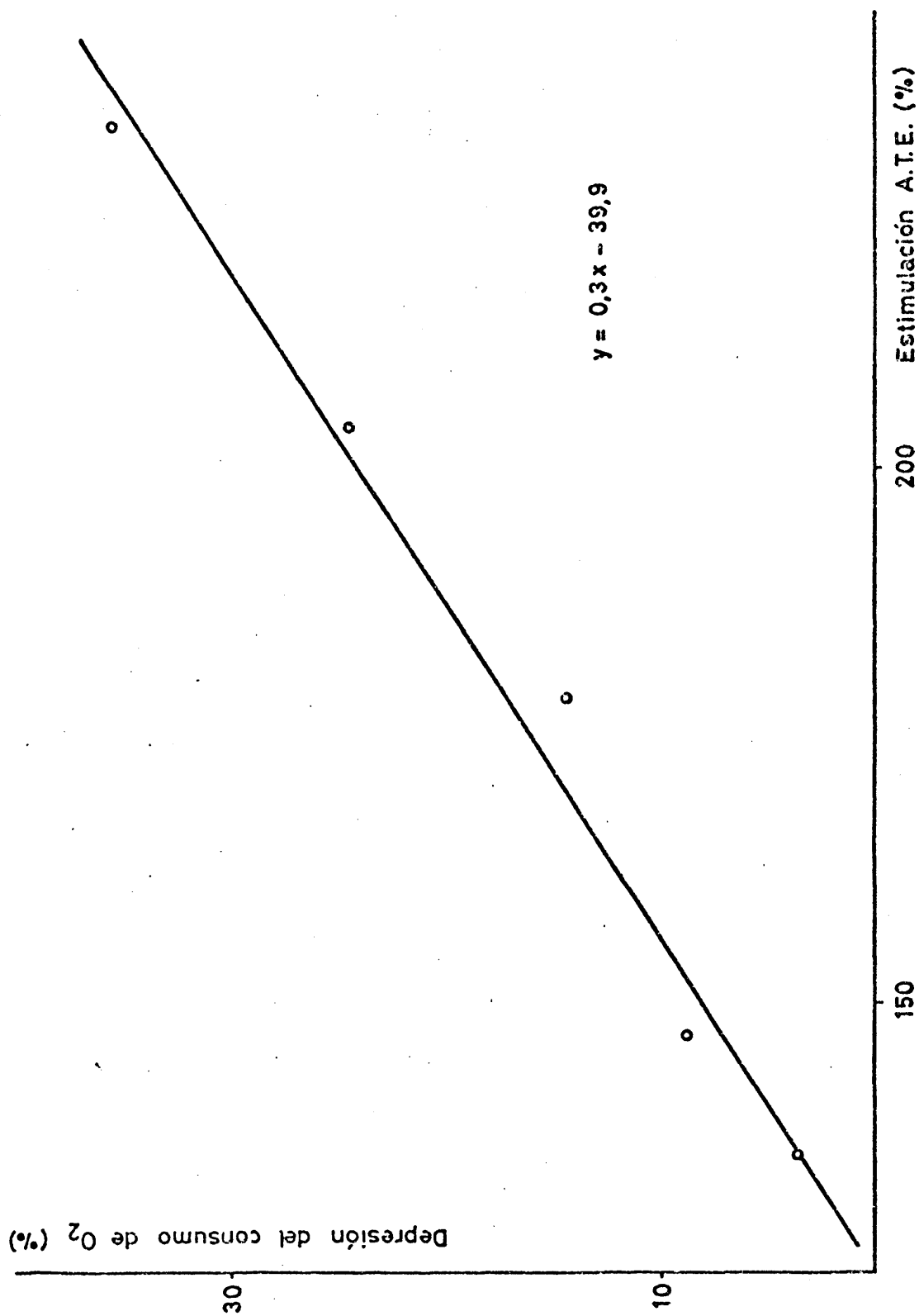


Fig. 32 - Correlación entre los consumos de oxígeno (valores de la fig. 30) y la actividad transportadora de electrones en cultivos de S. cerevisiae crecidos en medio no fermentable.

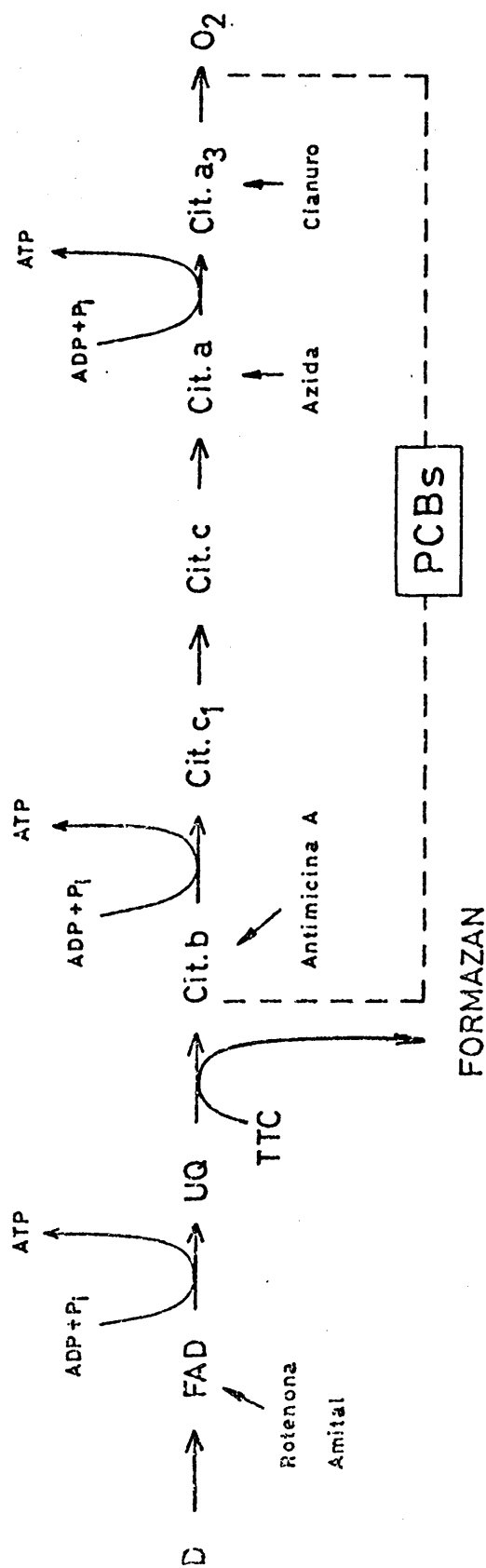


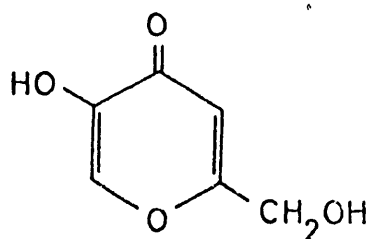
Fig. 33 -- Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se indican los puntos de acoplamiento de la fosforilación oxidativa, los niveles a que actúan diversos bloqueadores bien conocidos, y el paso al que se asocia la reducción del TTC. Los PCBs deben bloquear al menos parcialmente, alguna de las transferencias electrónicas situadas entre el citocromo b y el oxígeno molecular

Efectivamente, según se muestra en la fig. 32, son precisamente los Aroclor que más intensifican la reducción del TTC los que más deprimen el consumo de oxígeno, existiendo además una correlación lineal de elevada significación ---- ($>99\%$) entre ambos parámetros.

Si el oxígeno molecular se reduce a menos velocidad en los microorganismos dosificados con los xenobióticos, -- los transportadores de electrones en estado reducido se encontrarán, en relación con los microorganismos "control", en concentraciones más altas, lo que ahora explica la mayor velocidad de reducción del TTC. Pero si los electrones son transportados normalmente hasta el nivel Ubiquinona - citocromo b (que es el eslabón al que se acopla la reducción de las sales de tetrazolio, fig. 33), pese a lo cual existe un retardo en la reducción del oxígeno molecular, los efectos de los PCBs deben consistir precisamente en el bloqueo, al menos parcial, del transporte electrónico en alguno de los eslabones subsiguientes, es decir a nivel de citocromos.

7 - INFLUENCIA DE LOS PCBs SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO KOJICO.

Numerosos microhongos — en particular diversos *Aspergillus* — producen en aerobiosis ácido kójico (2-hidroximetil - 5-hidroxi - γ -pirona: 1) en proporciones significati-



(1)

vas, a partir de una gran variedad de fuentes hidrocarbonadas (aún siendo posible su preparación por vía sintética, la obtención industrial de este compuesto se lleva a cabo precisamente por procedimientos fermentativos).

Si bien su estructura química se conoce desde 1924 y en la actualidad se le han encontrado aplicaciones prácticas como sinergista de ciertos insecticidas (Mayer et al. 1946) y como intermediario en la síntesis de insecticidas (Metivier, 1957), fungicidas (O'Kane y Morey, 1949), antibióticos y drogas cardiovasculares (Krimel, 1955), el papel fisiológico exacto del ácido kójico en los microorganismos que lo producen, dista aún de encontrarse suficientemente aclarado.

Desde luego, su intensa actividad antibacteriana, especialmente frente a las bacterias Gram-negativas, y que ha sido estudiada por numerosos investigadores (Yabuta,

1912; Foster y Karrow, 1945; Morton et al. 1945), obliga a atribuirle un papel relevante en los fenómenos de antibiosis natural. Es posible, sin embargo, que sus funciones no se agoten aquí.

Las proporciones en que se forma el ácido kójico dependen directamente de la fuente de carbono disponible, -- siendo la glucosa el sustrato preferente, a través, según Arnstein y Bentley (1953a), de las rutas alternativas I - II - IIIa o I - II - IIIb - IV (fig. 34). No ha quedado descartada, sin embargo, la vía más directa glucosa - IIIa - ácido kójico, propuesta por Yabuta (1924) y asumida por Kinoshita (1927) y Haworth (1929), siendo probable la coexistencia de todas ellas. Por otra parte, los mismos Arnstein y Bentley (1953a y b) sugieren la posibilidad de que otras moléculas más pequeñas, como el acetato, glicerato, piruvato, etc., participen asimismo en la biosíntesis del ácido en cuestión, previa formación de triosafosfatos.

De cualquier modo que funcionen tales múltiples posibilidades biosintéticas, el hecho es que en un cultivo convencional de Aspergillus flavus sobre medio de Czapek, el contenido en ácido kójico alcanza los valores máximos al comienzo de la fase estacionaria, para disminuir gradualmente, hasta desaparecer, a lo largo de la fase de autólisis (Lahoz et al.), lo cual parece indicar que el microorganismo lo produce cuando se desarrolla en medio ricos en nutrientes, pudiendo reutilizarlo ulteriormente, en las fases deficitarias en fuentes exógenas de carbono. Si, por añadidura, se tiene en cuenta que en un ambiente natural los biotopos ricos en fuentes orgánicas de carbono son favo -

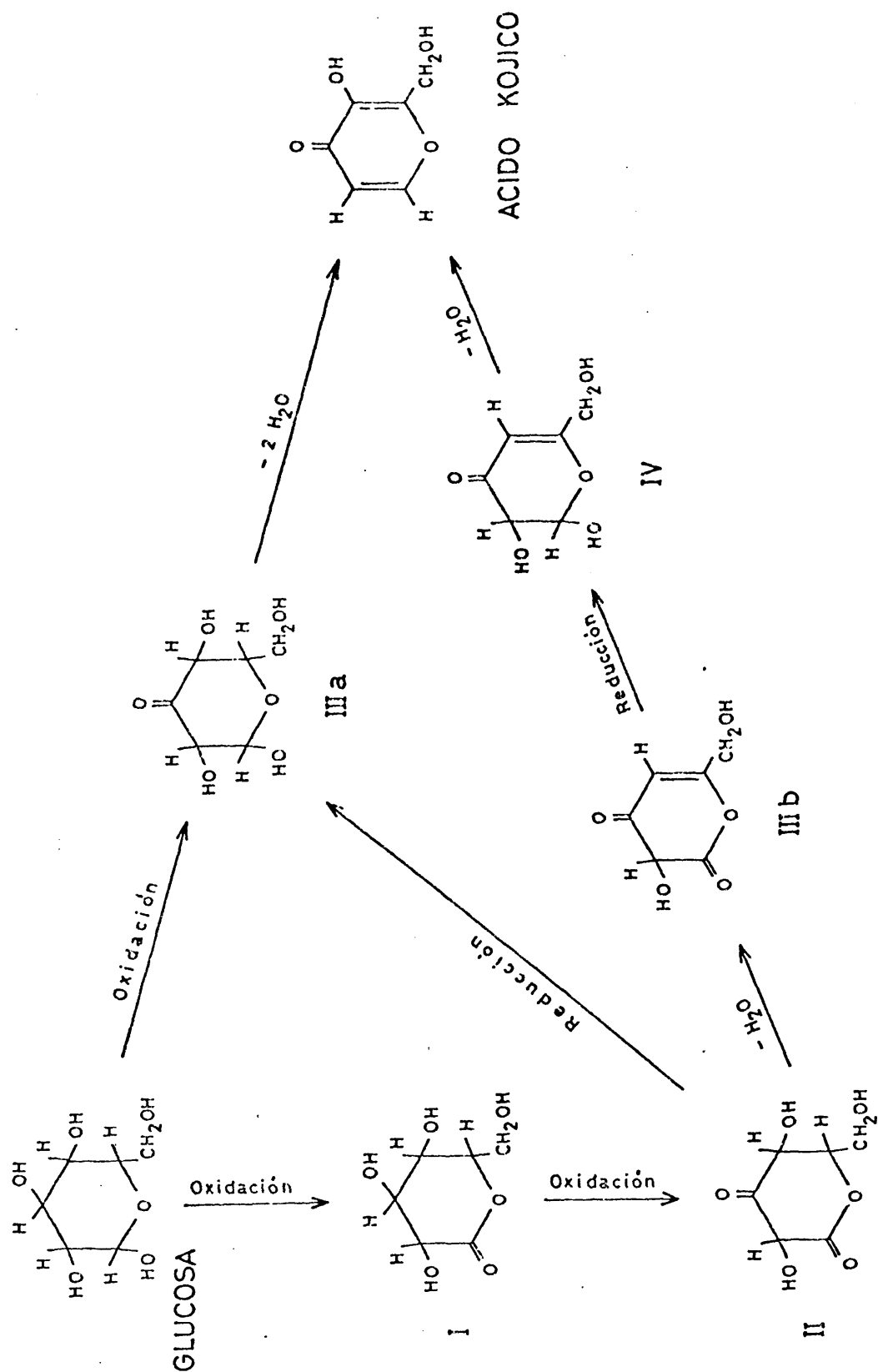


Fig. 34 - Posibles relaciones entre precursores piránicos del ácido kójico (síntesis a partir de varios autores).

rables al desarrollo de numerosos microorganismos en competencia trófica, es clara la coherencia entre la dinámica -- que sigue la producción de ácido kójico y su carácter antibiótico.

El estudio de dicha dinámica en cultivos de A. flavus dosificados con 25 ppm de los diferentes Aroclor puso de manifiesto que tanto si se considera el ácido kójico total -- producido por cada unidad de cultivo -- 50 ml de medio -- (fig. 35), como el producido por unidad de biomasa (fig. 36) resultan ser los Aroclor de grado de cloración medio -- A-1248 y A-1254 -- los que exaltan con mayor intensidad la -- síntesis del antibiótico, quedando la cota alcanzada en el caso del A-1242 ligeramente por encima de la del control y siendo el cultivo con A-1260 el que, una vez más, presenta el comportamiento más semejante al del control. Los efectos más notables se producen en el caso del A-1232, que determina una total abolición del ritmo de biosíntesis del compuesto en cuestión.

Tanto si el papel fisiológico del ácido kójico en Aspergillus flavus consiste en proveer al microorganismo de un mecanismo de antibiosis, como si se trata de una sustancia en cierto modo de reserva, como si contribuye a ambos fines, desde un punto de vista ecológico la producción de este compuesto es perfectamente interpretable como lo que, en terminología de MacArthur (1968), hoy generalizada (*),

(*) Según dicha terminología, los organismos "estrategas de la r" son los que basan su capacidad de competencia en

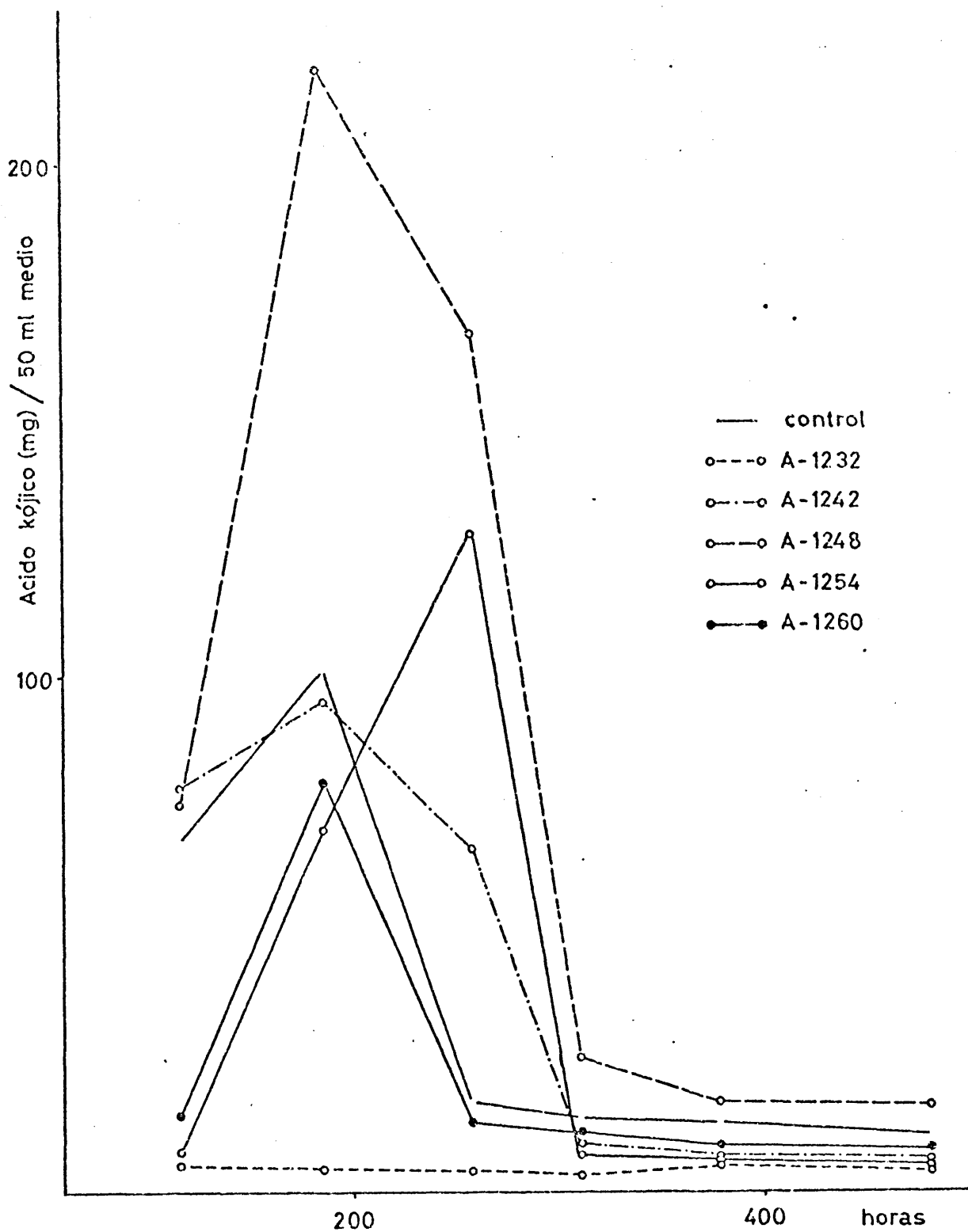


Fig. 35 - Evolución de los contenidos de ácido kójico en cultivos de A. flavus dosificados con 25 ppm de los distintos Aroclor.

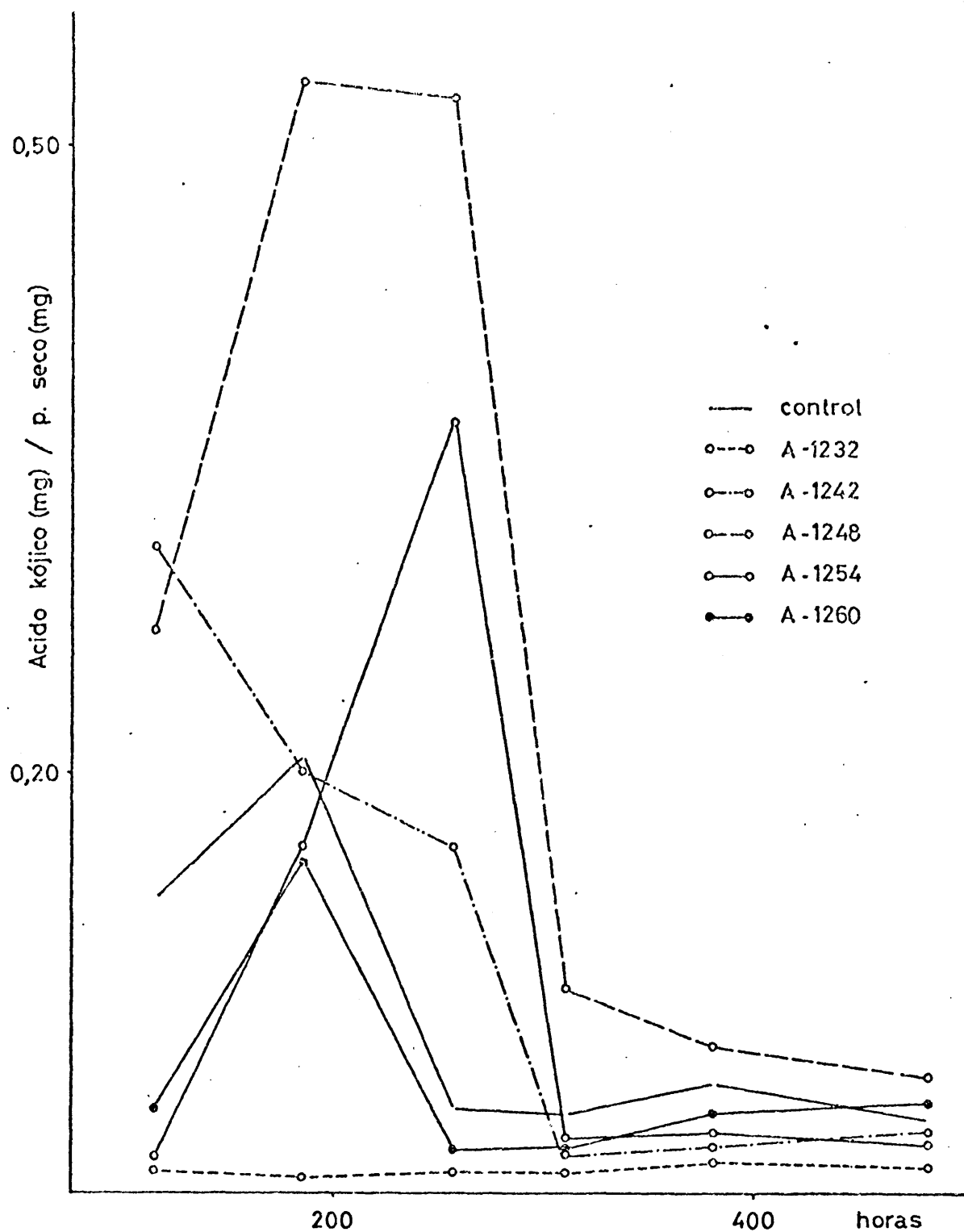


Fig. 36 - Evolución de los contenidos relativos de ácido kójico en cultivos de A. flavus dosificados con 25 ppm de los distintos Aroclor.

se conoce como un mecanismo "K".

La interferencia de los PCBs en tal mecanismo aparece un tanto confusa, por cuanto los distintos Aroclor parecen ejercer efectos en algunos casos opuestos. Queda claro, sin embargo, que la mezcla de bifenilos policlorados que, a juzgar por su influencia en todos los restantes parámetros biológicos estudiados en esta memoria resulta más tóxica (Aroclor-1232), inhibe fuertemente la biosíntesis del ácido kójico, lo cual se presta a interpretar como una reproducción a nivel de especie — lesión o pérdida de mecanismos "K" — de los efectos que los xenobióticos causan a nivel de ecosistema — regresión por creación de condiciones que favorecen a los organismos "estrategas de la r" —.

la producción de un elevado número de descendientes; los -- que invierten en la reproducción la fracción mayoritaria de sus posibilidades energéticas. Los "estrategas de la k", -- por el contrario, son aquellos que, produciendo un más escaso número de descendientes, disipan proporciones importantes de energía en el mantenimiento de mecanismos adaptativos más o menos sofisticados, que aseguran unas más altas -- tasas de supervivencia.

Naturalmente que entre las categorías teóricas extremas se encuentra toda una amplísima variedad de categorías reales y prácticas que representan soluciones de mayor o menor compromiso; que combinan mecanismos que sirven a distintas estrategias. Pero -- y a muy distintos niveles de finura -- es posible interpretar hacia dónde un determinado mecanismo, su refuerzo o su relajación, tienden a desplazar la estrategia adaptativa de un ser vivo.

"C" - C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

La recapitulación final de los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo experimental de la presente memoria, permite fundamentar las conclusiones que a continuación se resumen en los siguientes apartados:

1 - Ninguno de los microorganismos seleccionados, en ninguna de las modalidades de cultivo que se ensayaron, mostró capacidad para la transformación metabólica de los PCBs.

2 - En cultivos de Aspergillus flavus y Saccharomyces cerevisiae desarrollados en medios líquidos, el proceso de bioconcentración de los PCBs parece venir determinado exclusivamente por mecanismos pasivos de transporte. Siendo los niveles alcanzados en el estado de equilibrio lineal y directamente correlativos con el porcentaje medio de cloración - lipofilia - de los xenobióticos adicionados al medio, y satisfaciendo asimismo con un buen grado de ajuste la ecuación de Freundlich, el potencial de bioconcentración puede interpretarse como una resultante de las contribuciones debidas tanto a fenómenos de reparto como de adsorción, si bien no sea sencilla la diferenciación entre las respectivas contribuciones.

3 - Los efectos de los PCBs sobre Aspergillus flavus definen un cuadro toxicológico muy complejo, en el que la -

acción "directa" de los xenobióticos parece desempeñar un - papel secundario frente a las disfunciones resultantes de - la propia respuesta adaptativa del microorganismo, y en relación con el cual es preciso destacar los aspectos que a - continuación se describen.

4 - La intensidad de los efectos tóxicos en sus distintas manifestaciones varía en relación inversa con el porcentaje medio de cloración de los PCBs.

5 - Las manifestaciones más relevantes del cuadro toxicológico consisten en:

a) depresión del crecimiento, con una DI_{50} que, en el caso del Aroclor de perfil cromatográfico más similar al que producen los extractos de muestras ambientales (Aroclor-1254), se sitúa en las 10 ppm (valor experimental: 10,30).

b) estimulación de la biosíntesis de RNA cuyos niveles relativos en el micelio alcanzan valores que duplican a los normales asimismo para dosis de 10 ppm de Aroclor-1254 (valor experimental: 10,05).

c) exaltación del consumo de oxígeno por parte del microorganismo, que, al no traducirse en una superior velocidad en la síntesis de biomasa, supone una caída en los -- rendimientos del metabolismo energético.

d) alteración en los niveles y ritmos de producción de ácido Kójico.

6 - Como respuesta a la presencia de los PCBs, y en -- consonancia con los resultados obtenidos en torno a los niveles de RNA, en Aspergillus parece desarrollarse, con intensidad directamente relacionada con la toxicidad, un proceso de inducción de enzimas que, si bien resultan inefectivas -- frente al sustrato inductor, que queda inalterado (se trata, pues, de una inducción injustificada o gratuita), se muestran capaces de acelerar significativamente el metabolismo de otros xenobióticos, fenómeno para el que se propone el -- término de metabolismo aloinducido.

7 - Los efectos de los PCBs sobre Saccharomyces cerevisiae parecen responder a un mecanismo de actuación de naturaleza diferente al descrito para Aspergillus flavus, resultando, por otra parte, claramente dependientes del tipo predominante de metabolismo energético -- fermentativo o respiratorio -- impuesto por la fuente orgánica de carbono disponible en el medio. Así, en medios fermentables la intensidad de las manifestaciones tóxicas, particularmente en el -- caso del Aroclor-1232, alcanza valores significativamente más bajos que los encontrados cuando el microorganismo se -- ve obligado a satisfacer sus necesidades energéticas vía ciclo de Krebs (en glucosa: $DI_{50} = 46,7$; en etanol: $DI_{50} = 12,3$, para el A-1232).

8 - El grado de toxicidad de los Aroclor ensayados varía en relación inversa con su contenido medio en cloro, -- siendo esta variación, en lo que se refiere a los efectos sobre el peso seco de las cosechas, notablemente más acusada que la que se pone de manifiesto en la especie anterior.

9 - Los efectos de los PCBs sobre los intercambios de gases en medios no fermentables, guardando una correlación directa con el grado de toxicidad, consisten, al contrario que en Aspergillus flavus, en una depresión de los consumos de oxígeno.

10 - Según pone de manifiesto la evaluación conjunta - de los resultados micromanométricos y los correspondientes al estudio de la actividad transportadora de electrones, -- los PCBs bloquean dicha actividad, al menos parcialmente, a nivel de algún eslabón de los comprendidos entre el citocromo b y el oxígeno molecular.

11 - Tanto los resultados correspondientes a los niveles relativos de RNA -- que en esta última especie se muestran sustancialmente inalterables por la presencia de los PCBs -- , como los referentes a las incubaciones llevadas a cabo en presencia de varios xenobióticos, indican que, en Saccharomyces cerevisiae, los mecanismos de inducción enzimática no deben desempeñar un papel relevante en la respuesta del microorganismo a los tóxicos ensayados.

12 - La valoración, desde un punto de vista ecológico, del anterior conjunto de resultados, permite descubrir la profunda coherencia con que, a todos los niveles, se ponen de manifiesto las diferencias entre las estrategias adaptativas de los seres vivos. Así como el hecho de que el desplazamiento hacia estrategias de la "r" -- repetidamente señalado como respuesta de las comunidades biológicas a los trastornos ambientales -- constituye también, a nivel de in-

dividuo, una consecuencia de la acción de los xenobióticos.

Efectivamente, teniendo en cuenta que el Saccharomyces cerevisiae (Protoascomiceto) y Aspergillus flavus (Euascomiceto), constituyen dos entidades biológicas que, comparables por su relación filogenética, representan dos niveles evolutivos en los que el segundo, más avanzado, es más estrategia de la "k" que el primero, resulta de interés destacar :

a) El A. flavus (estratega de la "k") es más sensible a la acción de los PCBs que el S. cerevisiae (estratega de la "r").

b) Entre las manifestaciones de la actividad de los PCBs sobre A. flavus se cuenta la alteración de los ritmos de biosíntesis del ácido kójico (incidencia, pues, sobre un importante mecanismo "k").

c) Dadas las diferencias existentes entre los efectos de los PCBs sobre S. cerevisiae en medios fermentables y no fermentables, es inmediato suponer que si, en condiciones naturales, la levadura tuviese igualmente disponibles ambos tipos de sustratos, la presencia de los xenobióticos acentuaría el desplazamiento del metabolismo energético del microorganismo hacia las vías fermentativas, tendiendo a anular el papel de las respiratorias.

La mera tendendia a la pérdida de una posibilidad metabólica significa, sin duda, una pérdida de mecanismos "k".

Pero por añadidura, el proceso favorecido en este caso es -- la fermentación que, aunque según se ha visto, soporta un -- ritmo de crecimiento más rápido (otra manifestación "r") -- resulta -- puesto que el sustrato sólo se oxida parcialmente -- de menor eficiencia que la oxidación via ciclo de ---- Krebs. Pérdida de eficiencia que define a su vez un desplazamiento "k" \rightarrow "r".

d) Aunque ninguna de las dos especies es capaz de ejercer una acción metabólica sobre los PCBs, el *Aspergillus*, -- más evolucionado, parece poner en juego una respuesta inductiva que no se manifiesta en *Saccharomyces*. Respuesta, no -- obstante, que resulta estereotipada e inútil -- sino perjudicial -- , lo cual se presta a introducir ciertas dudas en la seguridad que muchos autores expresan sobre el valor de las posibles adaptaciones a los compuestos xenobióticos.

"D" - B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 - Anders, M.W. - Biochem. Pharmacol. 18, 2561 (1969).
- 2 - Arnstein, H.R.V.; Bentley, R. - Biochem. J. 54, 493 (1953 a).
- 3 - Arnstein, H.R.V.; Bentley, R. - Biochem. J. 54, 508 (1953 b).
- 4 - Arnstein, H.R.V.; Bentley, R. - Biochem. J. 54, 517 (1953 c).
- 5 - Baluja, G; Franco, J.M.; murado, M.A. - Inves. Pesq. 37 (3), 593 (1973).
- 6 - Bentley, R. - Meth. Enzymol. 3, 238 (1957).
- 7 - Bitman, J.; Cecil, H.C. - J. Agr. Food Chem. 18, 1108 (1970).
- 8 - Bolleg, J.M. - Adv. Appl. Microbiol. 18, 75 (1974).
- 9 - Brodie, B.; Axelrod, J. - J. Pharmacol. 94, 22 (1948).
- 10 - Brodie, B.; Burus, J.; Mark, L.; Lief, P.; Bernstein, E.; Papper, E. - J. Pharmacol. 109, 26 (1953).
- 11 - Brock, T.D. - "Biología de los microorganismos", pag. 187. Editorial Omega. Barcelona (1973).
- 12 - Brooks, G.T.; Harrison, A. - Biochem. Pharmacol. 18, 557 (1969).
- 13 - Burton, K. - Biochem. J. 60, 315 (1956).
- 14 - Cochin, J.; Axelrod, J. - J. Pharmacol. 125, 105 (1959).

- 15 - Chance, B. - "A symposium of the mechanism of enzyme action", pag. 339. Editors: W.D. McElroy and B. Glass. Baltimore: Johns Hopkins Press (1954).
- 16 - Chance, B.; Williams, G.R.; Holmes, W.F.; Higgins, J. - J. Biol. Chem. 217, 439 (1955).
- 17 - De Faubert, M.; Egan, H.; Codly, E.W.; Hammond, E.W.; Roburn, J.; Thompson, J. - Analyst, 89, 168 (1964).
- 18 - Dische, Z. - Mikrochemie, 8, 4 (1930).
- 19 - Duke, T.W.; Lowe, J.I.; Wilson, A.J. - Bull. Env. Cont. Tox. 5, 171 (1970).
- 20 - Foster, J.W.; Karow, E.O. - J. Bact. 49, 19 (1945).
- 21 - Foster, J.W. - "Chemical Activities of Fungi", Academic Press, New York (1949).
- 22 - Foster, J.W. - "The Oxygenases", pag. 241. Academic Press, New York (1962).
- 23 - Giles, K.W.; Myers, A. - Nature, 4979, 93 (1965).
- 24 - Goa, J. - Scand. Clin. Lab. Invest. 5, 218 (1953).
- 25 - Grant, D.L.; Phillip, W.E.J., Villeneuve, D.C. - Bull. Env. Cont. Tox. 6, 102 (1971).
- 26 - Greb, W.; Klein, W.; Coulston, F.; Golberg, L.; Korte, F. - Bull. Env. Cont. Tox. 13 (4), 424 (1975 a).
- 27 - Greb, W.; Klein, W.; Coulton, F.; Golberg, L.; Korte, F. - Bull. Env. Cont. Tox. 13 (4), 471 (1975 b).
- 28 - Green, D.E. - Sci. Amer. 210 (1), 63 (1964).
- 29 - Hansen, D.J.; Parrish, P.R.; Lowe, J.I. Wilson, A.J. - Bull. Env. Cont. Tox. 6, 113 (1971).
- 30 - Harris, A.B. - J. Gen. Microbiol. 47, 111 (1967).
- 31 - Hawes, M.L.; Kricher, J.C.; Urey, J.C. - Bull.

Env. Cont. Tox. 15 (1), 14 (1976).

32 - Haworth, W.N. - The Constitution of Sugars.
London: Edward Arnold and Co. (1929).

33 - Hernandez Saint-Aubin, L.M. - Tesis doctoral.
Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense
de Madrid (1976).

34 - Hodgson, E.; Tate, L.G.; Kulkarni, A.P.; Plapp,
F.W. - J. Agr. Food Chem. 22 (3), 360 (1974).

35 - Jensen, H.L. - Acta Agr. Scand. 13, 404 (1963).

36 - Jensen, S. - New Scientist, 32, 612 (1966).

37 - Jensen, S. - Comunicación privada, 1968.

38 - Jensen, S.; Sundström, G. - Ambio, 3, 70 (1974).

39 - Jonhson, B.T.; Kennedy, J.O. - Applied Microbiol.
26 (1), 66 (1973).

40 - Kaiser, K.L.E.; Wong, P.T.S. - Bull. Env. Cont.
Tox. 11 (3), 291 (1974).

41 - Katagiri, M.; Ganguli, B.N.; Gonsalus, I.C. -
J. Biol. Chem. 243, 3543 (1968).

42 - Kate, R.; Gillette, J.M. - J. Pharmacol. Exp.
Ther. 150 (2), 279 (1965).

43 - Kearney, P.C.; Nash, R.G.; Isensee, A.R. -
Chemical Fallout, 54. Charles C. Thomas Publisher.
Springfield. Illinois (1969).

44 - Keil, J.E.; Priester, L.E.; Sandifer, S.H. -
Bull. Env. Cont. Tox. 6, 156 (1971).

45 - Kinoshita, K. - Acta Phytochim. Tokyo 3, 31
(1927).

46 - Koeman, J.H.; Ten Noewer de Brauw, M.C.; de Vos,
R.H. - Nature, 221, 1126 (1969).

47 - Krimmel, C.P. - U. S. Pat. 2,715,130 (Aug. 1955).

- 48 - Lahoz, R.; Reyes, F.; Beltrá, R. - J. Gen. Microbiol. 45, 41 (1966).
- 49 - Lahoz, R.; Gonzalez Ibeas, J. - J. Gen. Microbiol. 53, 101 (1968).
- 50 - Lichtenstein, E.P.; Lang, T.T.; Anderegg, B.N. - Science, 181, 847 (1973).
- 51 - Lincer, J.L.; Peakall, D.B. - Nature, 228, 738 (1970).
- 52 - Litterst, C.L.; Farber, T.M.; Baker, A.M.; van Loon, E.J. - Toxicol. Applied. Pharmacol. 23, 112 (1972).
- 53 - Litterst, C.L.; van Loon, E.J. - Bull. Env. Cont. Tox. 11 (3), 206 (1974).
- 54 - MacArthur, R. - "Population, Biology and Evolution". Ed. by Lewontin. Syracuse Univ. Press (1968).
- 55 - Mayer, E.L.; Talley, F.B.; Woodward, C.F. - U.S. Dept. Agr. Bur. Entomol. Plant Quarantine, ET-709 (1946).
- 56 - Meijbaum, W. - Z. Physiol. 258, 117 (1939).
- 57 - Metivier, J. - U.S. Pat. 2,778,767 (Jan. 1957).
- 58 - Mitoma, Ch.; Posner, H.S.; Reitz, H.C.; Udenfiend, S. - Arch. Biochem and Biophys. 61, 431 (1956).
- 59 - Moilanen, K.W.; Crosby, D.G. - 165th Amer. Chem. Soc. Meeting. Dallas. Texas. (1973).
- 60 - Monod, J.; Pappenheimer, A.M.Jr.; Cohen-Beziere, G. - Biochem. Biophys. Acta, 9, 648 (1952).
- 61 - Morton, H.E.; Kocholaty, W.; Junowicz-Kocholaty, R.; Kelner, A. - J. Bact. 50, 579 (1945).
- 62 - Moza, P.; Weisgerber, J.; Klein, W; Korte, F. - Bull. Env. Cont. Tox. 12 (5), 541 (1974).

- 63 - Nash, I. - Biochem. J. 55, 416 (1953).
- 64 - Nebeker, A.V.; Puglisi, F.A. - Transactions Am. Fish. Soc. 103 (4), 722 (1974).
- 65 - Nelson, B.D.; Williams, C. - J. Agr. Food Chem. 19 (2), 339 (1971).
- 66 - O'Kane, W.C.; Morey, G.H. - U.S. Pat. 2,460,188 (jan. 1949).
- 67 - Omura,
- 68 - Onley, J.H.; Mills, P.A. - J. Ass. Off. A. Chemist. 45, 983 (1962).
- 69 - Ogur, M.; Rosen, G. - Arch. Biochem. 25, 262 (1950).
- 70 - Ogur, M.; St. John, R.; Nagai, S. - Science, 125, 928 (1957).
- 71 - Packard, T.T.; Healy, M.L. - J. Mar. Res. 26, 66 (1968).
- 72 - Packard, T.T. - J. Mar. Res. 29, 234 (1971).
- 73 - Pardini, R.S.; Heidker, J.C.; Fletcher, D.C. - Biochem. Pharmacol. 19, 2695 (1970).
- 74 - Pardini, R.S. - Bull. Env. Cont. Tox. 6 (6), 539 (1971).
- 75 - Parker, J.M.; Mattoon, J.R. - J. Bacteriol. 100 (2), 647 (1969).
- 76 - Peakall, D.B. - Nature, 216, 505 (1967).
- 77 - Peakall, D.B. - Scientific American (Apr. 1970).
- 78 - Peakall, D.B.; Lincer, J.L. - Bioscience, 20, 958 (1970).
- 79 - Peakall, D.B. - "Environmental Dynamics of Pesticides", pag. 343. Ed. Haque and V.H. Freed. Plenum Press. New York - London (1975).

- 80 - Potter, V.R.; Recknagel, R.O.; Hurlbert, R.B. - Fed. Proc. 10, 646 (1951).
- 81 - Randers, J.; Meadows, D.L. - "Los límites del crecimiento". Editorial Fondo de cultura económica. México (1972).
- 82 - Ray, J.W. - Biochem. Pharmacol. 16, 99 (1967).
- 83 - Risebrough, R.W.; Peakall, D.B.; Herman, S.G.; Kirven, M.N. - Nature, 220, 1098 (1968).
- 84 - Ruiz-Herrera, J.; Starkey, R.L. - J. Bacteriol. 99, 544 (1969).
- 85 - Schneider, W.C. - J. Biol. Chem. 161, 293 (1945).
- 86 - Schneider, W. C. - Methods in Enzimology, Vol III, 680 (1957).
- 87 - Schulte, E.; Acker, L. - Naturwissenschaften, 61, 79 (1974).
- 88 - Shibko, S; Koivistoinen, P.; Tratnyek, C.A.; Newhall, A.R.; Friedman, L. - Analytical Biochem. 19, 528 (1967).
- 89 - Sivalingan, P.M.; Yoshida, T.; Inada, Y. - Bull. Env. Cont. Tox. 10, 242 (1973).
- 90 - Smith, E.J.; van Loon, E.J. - Anal. Biochem. 31, 315 (1969),
- 91 - Sosa Lucero, J.C.; de la Iglesia, F.A. - Bull. Env. Cont. Tox. 10 (4), 248 (1973).
- 92 - Street, J.G.; Urry, F.M.; Wagstaff, D.J.; Blau, A.D. - Amer. Chem. Soc. Meeting. New York (Sep. 1969).
- 93 - Turner, J.C.; Green, R.S. - Bull. Env. Cont. Tox. 12 (6), 669 (1974).
- 94 - Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; Stauffer, J.F. - "Manometric Techniques". Burgess Publishing Co. Minneapolis (1957).

95 - Vos, J.G.; Koeman, J.H. - Toxicol. Applied Pharmacol. 17, 656 (1970).

96 - Vos, J.G.; van der Maas, H.L.; Ten Wdewer de Brauw, M.C.; de Vos, R.H. - Food Cosmet. Toxicol. 8, 625 (1970).

97 - Wildish, D.J. - Bull. Env. Cont. Tox. 5, 202 (1970).

98 - Yabuta, T - 8th Intern. Congr. Pure Applied Chem. (Appendix) 25, 455 (1912).

99 - Yabuta, T. - J. Chem. Soc. 125, 575 (1924).

100 - Yu. S.J.; Kiigemagi, U.; Terriere, L.C. - J. Agr. Food Chem. 19 (1), 6 (1971).

101 - Zepp, R.L.; Sanders, O.T.; Kirkpatrick, R.L. - Bull. Env. Cont. Tox. 12 (5), 518 (1974).